

**Rasterschubsuppression
in Mitochondrien der Hefe
Saccharomyces cerevisiae:
Identifizierung und Charakterisierung
daran beteiligter Translationsfaktoren**

Alexander Hüttenhofer

Disbui. München

1989



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554824_0058

**Rasterschubsuppression in Mitochondrien der Hefe
Saccharomyces cerevisiae:
Identifizierung und Charakterisierung daran
beteiligter Translationsfaktoren**

Dissertation der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Alexander Hüttenhofer
aus Neuburg / a. d. Donau

Juli 1989

1. Berichterstatter : Prof. Dr. F. Kaudewitz
2. Berichterstatter : Prof. Dr. H. Jäckle

Tag der mündlichen Prüfung : 1. 9. 1989

Aus aktuellen Gründen wurden Teile dieser Arbeit bereits veröffentlicht bzw. wurden zur Veröffentlichung eingereicht :

Hüttenhofer, A. , Sakai, H. and Weiss-Brummer, B. (1988)
Site-specific AT-cluster insertions in the mitochondrial
15S rRNA gene of the yeast *S. cerevisiae*
Nucleic Acids Res., 16, 8665-8674

Weiss-Brummer, B. and Hüttenhofer, A. (1989)
The paromomycin resistance mutation (par^r -454) in the
15S rRNA gene of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is
involved in ribosomal frameshifting
Mol. Gen. Genet., 217, 362-369

Weiss-Brummer, B. , Sakai, H. and Hüttenhofer, A. (1989)
A mitochondrial frameshift suppressor maps in the
 $\text{tRNA}^{\text{Ser-var1}}$ region of the mitochondrial genome of the
yeast *S. cerevisiae*
Curr. Genet., 15, 239-246

Hüttenhofer, A. , Weiss-Brummer, B. , Dirheimer, G. and Martin, R.
(1989)
A novel type of +1 frameshift-suppressor: a base sub-
stitution in the anticodon stem of a yeast mitochondrial
serine-tRNA causes frameshift suppression
EMBO J., eingereicht

INHALTSVERZEICHNIS

Einleitung	1
KAPITEL I: ALLGEMEINE EINLEITUNG	2
KAPITEL II: ALLGEMEINE EINLEITUNG	3
KAPITEL III: ALLGEMEINE EINLEITUNG	4
KAPITEL IV: ALLGEMEINE EINLEITUNG	5
KAPITEL V: ALLGEMEINE EINLEITUNG	6
KAPITEL VI: ALLGEMEINE EINLEITUNG	7
KAPITEL VII: ALLGEMEINE EINLEITUNG	8
KAPITEL VIII: ALLGEMEINE EINLEITUNG	9
KAPITEL IX: ALLGEMEINE EINLEITUNG	10
KAPITEL X: ALLGEMEINE EINLEITUNG	11
KAPITEL XI: ALLGEMEINE EINLEITUNG	12
KAPITEL XII: ALLGEMEINE EINLEITUNG	13
KAPITEL XIII: ALLGEMEINE EINLEITUNG	14
KAPITEL XIV: ALLGEMEINE EINLEITUNG	15
KAPITEL XV: ALLGEMEINE EINLEITUNG	16
KAPITEL XVI: ALLGEMEINE EINLEITUNG	17
KAPITEL XVII: ALLGEMEINE EINLEITUNG	18
KAPITEL XVIII: ALLGEMEINE EINLEITUNG	19
KAPITEL XIX: ALLGEMEINE EINLEITUNG	20
KAPITEL XX: ALLGEMEINE EINLEITUNG	21
KAPITEL XXI: ALLGEMEINE EINLEITUNG	22
KAPITEL XXII: ALLGEMEINE EINLEITUNG	23
KAPITEL XXIII: ALLGEMEINE EINLEITUNG	24
KAPITEL XXIV: ALLGEMEINE EINLEITUNG	25
KAPITEL XXV: ALLGEMEINE EINLEITUNG	26
KAPITEL XXVI: ALLGEMEINE EINLEITUNG	27
KAPITEL XXVII: ALLGEMEINE EINLEITUNG	28
KAPITEL XXVIII: ALLGEMEINE EINLEITUNG	29
KAPITEL XXIX: ALLGEMEINE EINLEITUNG	30
KAPITEL XXX: ALLGEMEINE EINLEITUNG	31
KAPITEL XXXI: ALLGEMEINE EINLEITUNG	32
KAPITEL XXXII: ALLGEMEINE EINLEITUNG	33
KAPITEL XXXIII: ALLGEMEINE EINLEITUNG	34
KAPITEL XXXIV: ALLGEMEINE EINLEITUNG	35
KAPITEL XXXV: ALLGEMEINE EINLEITUNG	36
KAPITEL XXXVI: ALLGEMEINE EINLEITUNG	37
KAPITEL XXXVII: ALLGEMEINE EINLEITUNG	38
KAPITEL XXXVIII: ALLGEMEINE EINLEITUNG	39
KAPITEL XXXIX: ALLGEMEINE EINLEITUNG	40
KAPITEL XL: ALLGEMEINE EINLEITUNG	41
KAPITEL XLI: ALLGEMEINE EINLEITUNG	42
KAPITEL XLII: ALLGEMEINE EINLEITUNG	43
KAPITEL XLIII: ALLGEMEINE EINLEITUNG	44
KAPITEL XLIV: ALLGEMEINE EINLEITUNG	45
KAPITEL XLV: ALLGEMEINE EINLEITUNG	46
KAPITEL XLVI: ALLGEMEINE EINLEITUNG	47
KAPITEL XLVII: ALLGEMEINE EINLEITUNG	48
KAPITEL XLVIII: ALLGEMEINE EINLEITUNG	49
KAPITEL XLIX: ALLGEMEINE EINLEITUNG	50
KAPITEL L: ALLGEMEINE EINLEITUNG	51
KAPITEL LI: ALLGEMEINE EINLEITUNG	52
KAPITEL LII: ALLGEMEINE EINLEITUNG	53
KAPITEL LIII: ALLGEMEINE EINLEITUNG	54
KAPITEL LIV: ALLGEMEINE EINLEITUNG	55
KAPITEL LV: ALLGEMEINE EINLEITUNG	56
KAPITEL LVI: ALLGEMEINE EINLEITUNG	57
KAPITEL LVII: ALLGEMEINE EINLEITUNG	58
KAPITEL LVIII: ALLGEMEINE EINLEITUNG	59
KAPITEL LIX: ALLGEMEINE EINLEITUNG	60
KAPITEL LX: ALLGEMEINE EINLEITUNG	61
KAPITEL LXI: ALLGEMEINE EINLEITUNG	62
KAPITEL LXII: ALLGEMEINE EINLEITUNG	63
KAPITEL LXIII: ALLGEMEINE EINLEITUNG	64
KAPITEL LXIV: ALLGEMEINE EINLEITUNG	65
KAPITEL LXV: ALLGEMEINE EINLEITUNG	66
KAPITEL LXVI: ALLGEMEINE EINLEITUNG	67
KAPITEL LXVII: ALLGEMEINE EINLEITUNG	68
KAPITEL LXVIII: ALLGEMEINE EINLEITUNG	69
KAPITEL LXIX: ALLGEMEINE EINLEITUNG	70
KAPITEL LXX: ALLGEMEINE EINLEITUNG	71
KAPITEL LXXI: ALLGEMEINE EINLEITUNG	72
KAPITEL LXXII: ALLGEMEINE EINLEITUNG	73
KAPITEL LXXIII: ALLGEMEINE EINLEITUNG	74
KAPITEL LXXIV: ALLGEMEINE EINLEITUNG	75
KAPITEL LXXV: ALLGEMEINE EINLEITUNG	76
KAPITEL LXXVI: ALLGEMEINE EINLEITUNG	77
KAPITEL LXXVII: ALLGEMEINE EINLEITUNG	78
KAPITEL LXXVIII: ALLGEMEINE EINLEITUNG	79
KAPITEL LXXIX: ALLGEMEINE EINLEITUNG	80
KAPITEL LXXX: ALLGEMEINE EINLEITUNG	81
KAPITEL LXXXI: ALLGEMEINE EINLEITUNG	82
KAPITEL LXXXII: ALLGEMEINE EINLEITUNG	83
KAPITEL LXXXIII: ALLGEMEINE EINLEITUNG	84
KAPITEL LXXXIV: ALLGEMEINE EINLEITUNG	85
KAPITEL LXXXV: ALLGEMEINE EINLEITUNG	86
KAPITEL LXXXVI: ALLGEMEINE EINLEITUNG	87
KAPITEL LXXXVII: ALLGEMEINE EINLEITUNG	88
KAPITEL LXXXVIII: ALLGEMEINE EINLEITUNG	89
KAPITEL LXXXIX: ALLGEMEINE EINLEITUNG	90
KAPITEL LXXXX: ALLGEMEINE EINLEITUNG	91
KAPITEL LXXXXI: ALLGEMEINE EINLEITUNG	92
KAPITEL LXXXXII: ALLGEMEINE EINLEITUNG	93
KAPITEL LXXXXIII: ALLGEMEINE EINLEITUNG	94
KAPITEL LXXXXIV: ALLGEMEINE EINLEITUNG	95
KAPITEL LXXXXV: ALLGEMEINE EINLEITUNG	96
KAPITEL LXXXXVI: ALLGEMEINE EINLEITUNG	97
KAPITEL LXXXXVII: ALLGEMEINE EINLEITUNG	98
KAPITEL LXXXXVIII: ALLGEMEINE EINLEITUNG	99
KAPITEL LXXXXIX: ALLGEMEINE EINLEITUNG	100

Für meine Mutter

Inhaltsverzeichnis

EINLEITUNG	1
MATERIAL UND METHODEN	9
KAPITEL I : ANALYSE EINER RESTRIKTIVEN MUTATION, WELCHE DIE SPONTANE RASTERSCHUB- SUPPRESSION DER RASTERSCHUBMUTANTE M5631 REDUZIERT	33
Einführung	33
Ergebnisse	36
1. Isolierung geeigneter rho ⁻ -Stämme der 15S rRNA Region aus dem rho ⁺ -Stamm KL14-4A	36
1.1 Isolierung und Analyse des rho ⁻ -Stammes KLA13	36
1.2 "Subklonierung" des rho ⁻ -Stammes KLA13	38
1.3 Isolierung und Analyse des rho ⁻ -Stammes K50	39
1.4 "Subklonierung" des rho ⁻ -Stammes K50	42
2. Genetische Kartierung der restriktiven Mutation	44
3. Molekulare Analyse der restriktiven Mutation	47
3.1 Sequenzierung des 365bp Bereiches im rho ⁻ -Stamm KV13	47
3.2 Identifizierung der restriktiven Mutation	48
4. Die Thal-Restriktionsstelle an Pos.1479 in Zellen mit leaky und reduziertem leaky Phänotyp	50
5. Analyse der mitochondrialen Translationsprodukte	51
6. Die par ^r -454 Mutation und Resistenz gegen das Antibiotikum Paromomycin	52
Diskussion	56
KAPITEL II : EINE NEUE CLUSTER SPEZIES IN MITOCHON- DRIEN : SPEZIFISCHE AT-CLUSTER INSERTIONEN IN DER MITOCHONDRIALEN 15S rRNA DER HEFE SACCHAROMYCES CEREVISIAE	69
Einführung	69

Ergebnisse	71
1. DNA-Sequenz der 15S rRNA der Stämme M5631, 777-3A und KL14-4A	71
1.1 Kartierung des 15S rRNA Genes durch Southernblotting	71
1.2 Klonierung der 2000bp HpaII-Fragmente	72
1.3 Subklonierung der 2000bp HpaII-Fragmente	72
1.4 DNA-Sequenz der 15S rRNA Gene der Stämme M5631, 777-3A und KL14-4A	73
2. Bestimmung des 5'-Endes der 15S rRNAs der Stämme 777-3A und KL14-4A	75
3. Sekundärstrukturmodell der 15S rRNA	78
4. Optionale AT-Cluster Insertionen	80
5. ATCL3 und ATCL4, zwei weitere, nicht optionale AT-Cluster	81
6. Stellen ATCLs Introns der mitochondrialen 15S rRNA dar?	84
7. Optionale GC-Cluster Insertionen	84
Diskussion	86

KAPITEL III : ISOLIERUNG UND ANALYSE VON SUPPRESSORMUTATIONEN, WELCHE DIE SPONTANE RASTERSCHUBSUPPRESSION DER RASTERSCHUBMUTANTE M5631 VERSTÄRKEN	96
--	-----------

Einführung	96
-------------------	-----------

Ergebnisse	98
1. Der reduziert leaky wachsende Stamm HS2-5631	98
2. Isolierung von Rasterschubsuppressoren im Stamm HS2-5631	98
3. Genetische Analyse des Suppressorstammes SEG15	100
3.1 Mitochondriale Lokalisation der Suppressormutation	100
3.2 Bestimmung des mitochondrialen Genbereiches	102
4. Genetische Charakterisierung des rho-Klones SEG15/S1	105
4.1 Kartierung des rho-Klones SEG15/S1 durch mit-Kreuzungen	105
4.2 Wirkung der Suppressormutation mfs-1 auf andere Rasterschub-, Missense- oder Ochre-Mutationen	106
5. Molekulare Analyse der Suppressormutation mfs-1	106

5.1	Restriktionsanalyse des rho-Genomes im Stamm SEG15/S1	106
5.2	Sequenzanalyse der mfs-1 Mutation	108
6.	Eine tRNA ^{Ser} Mutante als Suppressor der Raster-schubmutation M5631	112
7.	Analyse der tRNA ^{Ser} UCN-Transkripte	114
7.1	Northernblot-Analyse	114
7.2	S1-Kartierung der tRNA ^{Ser} UCN-Transkripte	115
7.2.1	Bestimmung des 5'-Endes	115
7.2.2	Bestimmung des 3'-Endes	116
8.	Zweidimensionale Gelelektrophorese von tRNAs	116
8.1	Radioaktive Markierung von tRNAs	116
8.2	Zweidimensionale Gelelektrophorese	118
9.	tRNA Sequenzierung	119
9.1	T ₁ -Ribonuklease-Sequenzierung	119
9.2	Modifikationsbestimmung	121
10.	Strukturanalyse der Suppressor tRNA ^{Ser} UCN	123
11.	Aminoacylierung von Suppressor- und Wildtyp-tRNA ^{Ser}	125
11.1	Beladungskinetik	125
11.2	Test auf Maximalbeladung der tRNA ^{Ser} UCN	126
12.	Die mfs-1 Mutation im Stamm M5631	127
	Diskussion	130
	ZUSAMMENFASSUNG	143
	LITERATURVERZEICHNIS	146



EINLEITUNG

Die Mitochondrien der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, im haploiden Zustand ca. 50 pro Zelle, sind genetisch teil-autonom. Sie besitzen zwar eine eigene ca. 80 kb lange DNA, ein Replikations-, Transkriptions- und Translationssystem, die Komponenten hierfür sind aber größtenteils von Kerngenen kodiert, werden von cytoplasmatischen Ribosomen synthetisiert und in die Mitochondrien importiert. Die Biogenese der Mitochondrien erfordert somit ein komplexes Zusammenspiel zwischen Kern und Mitochondrium.

Im letzten Jahrzehnt wurden in der Mitochondrienforschung folgende drei Hauptaspekte bearbeitet :

1. Mitochondriale Genexpression
2. Interaktionen zwischen Zellkern und Mitochondrium
3. Proteinimport in Mitochondrien

Die vorliegende Arbeit ist dabei dem ersten Aspekt, der mitochondrialen Genexpression zuzuordnen. Der traditionelle Weg für diese Studien ist es, spezifische Mutanten mit atmungsdefekten Mitochondrien zu isolieren. Da die Hefe ein fakultativer Anaerobier ist, können diese Hefemutanten auf einem Medium mit einer vergärbaren Kohlenstoffquelle wachsen, wohingegen dies auf einer nicht vergärbaren Kohlenstoffquelle nicht möglich ist; d.h. atmungsdefekte mitochondriale Hefemutanten sind in einem geeigneten Medium leicht zu propagieren. Die erhaltenen Mutanten können weiterhin mit genetischen und molekulargenetischen Methoden gut charakterisiert werden.

Auf dem mitochondrialen Genom (Abb.1) sind Komponenten des mitochondrialen Translationsapparates kodiert. Dies sind die Gene für die 21S rRNA (Bestandteil der großen ribosomalen Untereinheit) und die 15S rRNA (Bestandteil der kleinen ribosomalen Untereinheit). Weiterhin kodiert das mitochondriale Genom für den kompletten Satz an tRNAs (in der Darstellung symbolisiert durch Striche). Eine Besonderheit des mitochondrialen Systems ist, daß 24 tRNAs ausreichend sind, um alle vorhandenen Codons zu dekodieren. Nach der Wobble-Hypothese wären hierfür jedoch mindestens 32 tRNAs erforderlich. Die Hefe kommt mit einer geringeren Anzahl deswegen aus, weil Codonfamilien von einer tRNA mit einer nicht modifizierten U-Base in der Wobbleposition gelesen werden können. Dieses unmodifizierte U kann mit allen vier Basen (A, G, C und U) paaren.

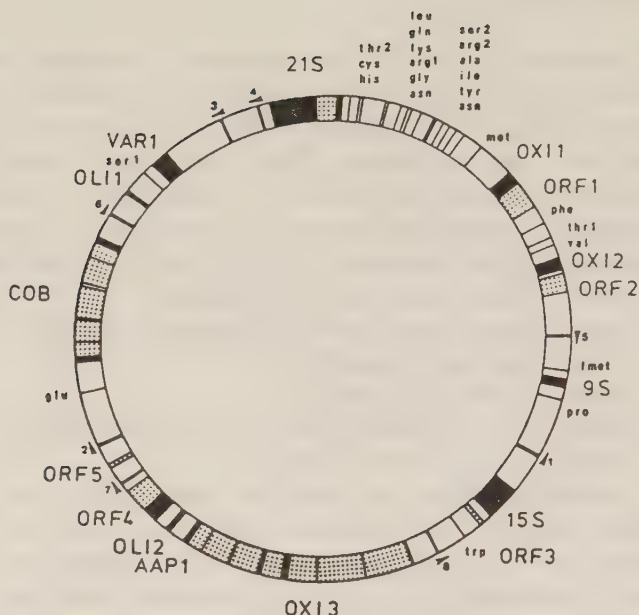


Abb.1 : Karte des mitochondrialen Genomes

Exons sind durch dunkle, Introns und intergenische ORFs (offene Leserahmen) durch gepunktete Linien wiedergegeben. Die Replikationsstartsequenzen (ORI1 bis 8) sind mit Pfeilen markiert, welche zugleich ihre relative Orientierung im Genom wiedergeben. Die Gene OX11, 2 und 3 kodieren die UE II, III und I der Cytochrom-c-Oxidase; COB, Cytochrom b; AAP1, OLI2 und OLI1 die UE8, 6 und 9 der ATPase. Var1 kodiert ein Protein, welches mit der kleinen Untereinheit des mitochondrialen Ribosomes assoziiert ist. 15S und 21S sind die Gene für die kleine und große rRNA, 9S kodiert eine RNA, welche an der Prozessierung der tRNAs beteiligt ist.

Außerdem sind auf dem mitochondrialen Genom das Gen für die 9S RNA (tRNA-Syntheselocus) und das var1-Gen (kodiert für ein ribosomales Protein) lokalisiert. Alle anderen Komponenten des mitochondrialen Translationsapparates sind kernkodiert und werden in die Mitochondrien importiert.

Schließlich sind auf diesem Genom Proteine kodiert, die als Bestandteile der Atmungskette fungieren. Es handelt sich um stark hydrophobe Membranproteine, die am Aufbau der Atmungskette als Un-

tereinheiten von multimeren Komplexen beteiligt sind. Dazu zählen die Gene für die Untereinheiten I, II und III der Cytochrom-c-Oxidase, Apocytochrom b und die Untereinheiten 6, 8 und 9 der ATPase. Gewöhnlich führen Mutationen in Genen dieser Proteine zur Atmungsdefizienz des betreffenden Stammes.

Bei der Untersuchung mitochondrialer Mutanten isolierten Fox und Weiss-Brummer (1980) den Stamm M5631, der in seiner mitochondrialen Genexpression zwar beeinträchtigt, nicht aber völlig atmungsdefekt war. Die Sequenzanalyse des Mutationsortes ergab eine Baseninsertion im oxil-Gen, welches für die Untereinheit II der Cytochrom-c-Oxidase kodiert. Dabei handelt es sich um die Insertion einer T-Base in eine monotone Abfolge von fünf T-Basen in diesem Gen (Fox und Weiss-Brummer, 1980, siehe Abb.2). Eine solche Mutation wird als Rasterschubmutation bezeichnet. Die Insertion dieser Base hat zur Folge, daß sich der Leserahmen um eine Base verschiebt (ein sogenannter Rasterschub), was dazu führt, daß im neuen Leserahmen 29 Codons nach der Mutationsstelle ein vorzeitiges TAA-Stopcodon auftritt (Abb.2). Dies führt zu einem verkürzten nicht-funktionalen Protein von 12.5 kD Länge, während im entsprechenden Wildtypstamm ein funktionales 32 kD Protein gebildet wird (Fox und Weiss-Brummer, 1980).

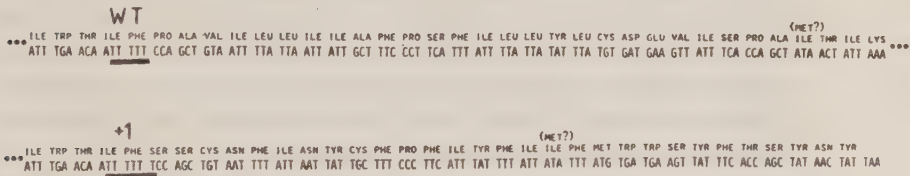


Abb.2 : M5631 Mutationsort

Oben : Ausschnitt der Wildtypsequenz (WT) aus dem oxil-Gen, welcher den Mutationsort (unterstrichen) beinhaltet; unten : die +1T Insertion der M5631 Mutation, die eine Verschiebung des Wildtypleserahmens verursacht, was zu einem vorzeitigen Stopcodon (TAA) führt.

Trotz dieser Rasterschubmutation im oxil-Gen ist die Mutante M5631 aber fähig, auf nicht vergärbaren Medien "leaky" zu wachsen. Dieses "leaky"-Wachstum zeichnet sich dadurch aus, daß die Mutante

M5631 nicht bei 23°C, wohl aber bei 30°C und 36°C wachsen kann, jedoch schwächer als der Wildtyp. Damit die Zellen die Befähigung haben leaky zu wachsen, muß man postulieren, daß in der Mutante M5631 auch eine gewisse Menge an funktionalem oxil-Genprodukt gebildet werden kann. Dies sollte in den Zellen nachweisbar sein. Tatsächlich ergab eine Analyse der mitochondrialen Translationsprodukte, daß in der Mutante M5631 neben dem nicht funktionalen 12.5 kD Proteinfsegment der Untereinheit II der Cytochrom-c-Oxidase zusätzlich ein funktionales 32 kD Protein gebildet wird, jedoch nur 20% von der Menge, die im Wildtypstamm synthetisiert wird (Fox und Weiss-Brummer, 1980).

Wie kommt dieses Produkt im Mutantenstamm M5631 zustande? Das 32 kD Protein kann in diesem Stamm nur gebildet werden, wenn man postuliert, daß der durch eine Baseninsertion veränderte Leserahmen im oxil-Gen zurück in den Wildtypleserahmen verschoben wird (vgl. Abb.2). Dies sollte in der Mutante statistisch gesehen in jeder fünften Translationsrunde der oxil-mRNA stattfinden, da ca. 20% an 32 kD Protein gebildet werden.

Das Verschieben eines mutativ veränderten Leserahmens zurück in den Wildtypleserahmen wird als Rasterschubsuppression bezeichnet. Kreuzungsanalysen zeigten, daß diese Rasterschubsuppression in der Mutante M5631 nicht durch eine Zweitmutation hervorgerufen wird, sondern daß bereits der entsprechende Wildtypstamm 777-3A diese Fähigkeit besitzt (Weiss-Brummer et al., 1987). Die Rasterschubsuppression findet also unter Mitwirkung des Wildtyptranslationsapparates der Mutante M5631 statt und wird daher im folgenden als "spontane Rasterschubsuppression" bezeichnet.

Das Phänomen der spontanen oder auch natürlichen Rasterschubsuppression ist schon seit einigen Jahren bekannt. Frühere Untersuchungen in Prokaryonten, Retroviren und Eukaryonten zeigten, daß dieser Mechanismus zur Expression von zwei Genen führen kann, deren Leserahmen sich überlappen aber nicht in Phase miteinander sind (Review-Artikel : Craigen und Caskey, 1987).

Welche Erkenntnisse lassen sich nun aus dem Studium der Rasterschubsuppression erwarten und warum ist das System der Hefe hierfür gut geeignet?

Untersuchungen über den Mechanismus der spontanen Rasterschubsuppression können zur Identifizierung von Komponenten des

Translationsapparates führen, welche die Translationsgenauigkeit beeinflussen. Durch mutative Veränderungen von Genen mitochondrialer Translationskomponenten (d.h. rRNAs, tRNAs) der Rasterschubmutante M5631 sollte versucht werden, solche Mutationen zu isolieren, durch welche die spontane Rasterschubsuppression dieses Stammes verstärkt oder vermindert werden konnte.

Da "Rasterschubsuppression" die Verschiebung eines vorgegebenen Leserahmens bedeutet (im Fall der Mutante M5631 eine Verschiebung zurück in den Wildtypleserahmen), werden folglich Mutationen, die diese Verschiebung beeinflussen, in solchen Genen zu finden sein, welche an der Einhaltung des Tripletleserahmens (also an der Translationsgenauigkeit) unmittelbar beteiligt sind. Die molekulare Analyse solcher Mutationen erlaubt somit die Identifizierung von Genen, welche eine Schlüsselrolle in der mitochondrialen Translationsgenauigkeit bezüglich der Einhaltung des Leserahmens spielen.

Das mitochondriale Translationssystem eignet sich besonders gut als Modellsystem für diese Untersuchungen. Die Gene der ribosomalen RNAs liegen singular vor und nicht in mehrfacher Kopie, wie z.B. bei *E. coli*. Auch gibt es kaum isoakzeptierende tRNAs. Dies bedeutet, daß sich Mutationen direkt phänotypisch ausprägen. Hierbei sind diese Mutationen nicht lethal, da atungsdefekte Zellen in einem vergärbaren Medium gezüchtet werden können. Die zur Verfügung stehenden genetischen Analysen haben ein hohes Auflösungsvermögen. Zur Aufklärung des Mechanismus der Rasterschubsuppression können klassische genetische mit molekularen Methoden kombiniert werden. Dabei ist die Rasterschubmutante M5631 für diese Untersuchungen gut geeignet, da die Verminderung oder Verstärkung der Translationsgenauigkeit unmittelbar die spontane Rasterschubsuppression und damit auch das leaky-Wachstum der Mutante beeinflusst.

So sollte etwa eine Verminderung der spontanen Rasterschubsuppression durch mutative Veränderung bestimmter Translationskomponenten eine reduzierte Bildung des durch die Rasterschubmutation betroffenen oxil-Genproduktes bewirken. Dies wiederum verringert das leaky-Wachstum der Rasterschubmutante M5631, was leicht auf nicht vergärbaren Medien überprüft werden kann. Umgekehrt gilt, daß Mutationen, welche die spontane Rasterschubsuppression verstärken, eine Steigerung des leaky-Wachstums der Mutante verursachen. Somit finden alle Mutationen, die die mitochondriale Trans-

lationsgenauigkeit und damit die spontane Rasterschubsuppression dieses Stammes betreffen, eine unmittelbare phänotypische Ausprägung in der Wachstumsstärke auf nicht vergärbaren Medien. Diese Mutationen können daher einfach identifiziert und isoliert werden.

Eine Mutation, welche eine Verminderung der spontanen Rasterschubmutation dieses Stammes verursacht, war bereits von Weiss-Brummer et al. (1987) durch genetische Analysen auf dem mitochondrialen Genom kartiert worden. Diese Mutation wurde dabei von obigen Autoren bei der Fragestellung identifiziert, ob nicht nur der mitochondriale Translationsapparat der Mutante M5631, sondern auch die mitochondrialen Translationsapparate anderer Stämme die Fähigkeit zur spontanen Rasterschubsuppression besitzen.

Um dies zu untersuchen, wurden die Gene für Komponenten des mitochondrialen Translationsapparates der Mutante M5631 (d.h. tRNA-, 15S rRNA- und 21S rRNA-Gene) in genetischen Kreuzungen durch entsprechende Gene anderer Wildtypstämme ersetzt. Anschließend wurde die Fähigkeit dieser rekombinanten mitochondrialen Genome getestet, die Rasterschubmutation M5631 zu supprimieren (siehe oben).

Weiss-Brummer et al. (1987) konnten zeigen, daß der rekombinatorische Austausch der 15S rRNA Region der Mutante M5631 durch die 15S rRNA Region des Wildtypstammes KL14-4A eine erhebliche und spezifische Reduzierung der spontanen Rasterschubsuppression zur Folge hatte. Eine spezifische Reduzierung bedeutet, daß nur die Untereinheit II der Cytochrom-c-Oxidase, deren Gen die Rasterschubmutation enthält, vermindert synthetisiert werden sollte, während alle anderen mitochondrialen Proteine in normalen Mengen zu erwarten sind. Dies konnte von Weiss-Brummer et al. (1987) in den rekombinanten Stämmen tatsächlich nachgewiesen werden.

Das war ein Hinweis darauf, daß die 15S rRNA der Mutante M5631 und des Stammes KL14-4A sich dadurch unterscheiden, daß erstere in der Lage ist, eine spontane Suppression der Rasterschubmutation M5631 zu ermöglichen, letztere nur in weit geringerem Ausmaße. Ziel der vorliegenden Arbeit war es nun, die molekulare Ursache für die reduzierte Rasterschubsuppression oder anders ausgedrückt, für

die erhöhte Translationsgenauigkeit im 15S rRNA Gen des Stammes KL14-4A zu analysieren.

Von Gorini et al. (1974) waren bereits Mutationen in ribosomalen Proteingenen beschrieben, welche die Translationsgenauigkeit in *E. coli* erhöhen. Gorini et al. bezeichneten diese Mutationen als "restriktiv". Analog zu dieser Nomenklatur sollte die "restriktive Mutation" im Stamm KL-14A, welche die spontane Rasterschubmutation der Mutante M5631 reduziert, zunächst auf genetischem Wege einem bestimmten Bereich des 15S rRNA Genes zugeordnet werden. Anschließend war beabsichtigt, diese Region des 15S rRNA Genes von Mutante M5631 und Wildtypstamm KL14-4A auf Sequenzebene zu untersuchen, um die molekulare Ursache der restriktiven Mutation aufzuklären.

In einem zweiten Teil war geplant, nicht nur die restriktive Mutation zu bestimmen, sondern auch ein Sekundärstrukturmodell der 15S rRNA der Stämme M5631 bzw. KL14-4A zu erstellen. Dieses Modell des 15S rRNA Moleküles ist dabei für die Interpretation der Daten bezüglich der restriktiven Mutation von essentieller Bedeutung. Um ein Sekundärstrukturmodell der 15S rRNA aufzustellen, wurden die entsprechenden Strukturgene der Stämme KL14-4A und M5631 vollständig sequenziert, und gleichzeitig Sequenzvergleiche mit bereits untersuchten 15S rRNA Genen anderer Wildtypstämme durchgeführt.

Im dritten Teil der Arbeit war beabsichtigt, im rekombinanten Genom der Mutante M5631, welche die restriktive Mutation des Stammes KL14-4A enthielt, Suppressormutationen zu induzieren. Diese sollten in der Lage sein, die durch die restriktive Mutation verursachte Reduzierung der Rasterschubsuppression wiederum zu kompensieren. Auf diese Weise sollten Mutationen in weiteren Faktoren isoliert werden, welche die mitochondriale Translationsgenauigkeit beeinflussen. Es war beabsichtigt, diese Mutationen, analog der restriktiven Mutation, zuerst genetisch zu kartieren und anschließend auf molekularer Ebene zu untersuchen.

Diese Arbeit ist daher in drei Kapitel unterteilt, die jeweils eine kurze Einführung, sowie einen Ergebnissteil mit anschließender Diskussion enthalten.

Kapitel I : die Identifizierung der restriktiven Mutation im 15S rRNA Gen des Stammes KL14-4A.

Kapitel II : die 15S rRNA Gene der Stämme KL14-4A und M5631,
ein Vergleich.

Kapitel III : Suppressormutationen der restriktiven Mutation im
Stamm KL14-4A.

MATERIAL UND METHODEN

I. MATERIAL

1. Organismen

1.1 Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae*

1.1.1 Verwendete Stämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Stämme sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Besondere Nomenklaturen der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* :

rho⁰ : totaler Verlust des mitochondrialen Genomes.

rho⁻ : partieller Verlust des mitochondrialen Genomes durch Deletionen. Verbliebene Genomsequenzen werden so oft in Tandem- oder Palindromform reiteriert, bis sie die Größe des rho⁺-Genomes erreichen.

rho⁺ : vollständiges mitochondriales Genom, ohne Verluste mitochondrialer Sequenzen wie bei rho⁻ bzw. rho⁰-Genomen.

mit⁻ : mitochondriale Punktmutation oder kleine Deletion/Insertion, welche die Atmungsdefizienz des entsprechenden Stammes verursacht.

mit⁺ : mitochondriales Wildtypgenom ohne Mutation.

Antibiotika-Resistenz-Marker :

cap^r-321 : Chloramphenicol-Resistenz-Lokus (Coen et al., 1970)

cap^s : Wildtyp-Allel zu cap^r (Chloramphenicol-sensibel)

par^r-454 : Paromomycin-Resistenz-Lokus (Kutzleb et al., 1973)

par^s : Wildtyp-Allel zu par^r (Paromomycin-sensibel)

oli^r-1 : Oligomycin-Resistenz-Lokus (Avner et al., 1973)
 oli^s : Wildtyp-Allel zu oli^r (Oligomycin-sensibel)

Genotyp			Referenz
Stamm	nuklear	mitochondrial	
777-3A	α adel, opl	rho ⁺ , mit ⁺ , par ^s	Kotylak und Slonimski (1977)
M5631	α adel, opl	rho ⁺ , mit ⁺ , par ^s	Weiss-Brummer et al. (1979)
777-3A-4901	α adel, opl	rho ⁺ , mit ⁺ , (cob ⁻)	H. Bechman (1981)
777-3A-7374	α adel, opl	rho ⁺ , mit ⁺ , (oxi3 ⁻)	H. Bruckner, nicht publiziert
777-3A-5821	α adel, opl	rho ⁺ , mit ⁺ , (oxi1 ⁻)	Weiss-Brummer et. al. (1979)
777-3A-5491	α adel, opl	rho ⁺ , mit ⁺ , (oxi2 ⁻)	B. Weiss-Brummer, nicht publiziert
KL14-4A	a his1, trp2	rho ⁺ , mit ⁺ , cap ^r -321, par ^r -454, oli ^r -1	Wolf et al. (1973)
KL14-4A/A1	■ his1, trp2	rho ^o	
KV13	■ his1, trp2	rho ⁻ , par ^r -454	diese Arbeit
KV14	a his1, trp2	rho ⁻ , par ^r -454	diese Arbeit
KV15	■ his1, trp2	rho ⁻ , par ^r -454	diese Arbeit
KVV1	■ his1, trp2	rho ⁻ , par ^r -454	diese Arbeit
KVV7	a his1, trp2	rho ⁻	diese Arbeit
KVV3	■ his1, trp2	rho ⁻	diese Arbeit
KV6	■ his1, trp2	rho ⁻	diese Arbeit
KV8	■ his1, trp2	rho ⁻	diese Arbeit
KV9	■ his1, trp2	rho ⁻	diese Arbeit
1A	■ his1, trp2	rho ⁻	diese Arbeit
HS2-5631	a his1, trp2	rho ⁺ , mit ⁺ , cap ^r -321, par ^r -454	Weiss-Brummer et al. (1987)
SEG15	a his1, trp2	rho ⁺ , mit ⁺ , cap ^r -321, par ^r -454	diese Arbeit
SEG15/S1	a his1, trp2	rho ⁻	diese Arbeit
SEG15/S5	a his1, trp2	rho ⁻	diese Arbeit
SEG15/S6	a his1, trp2	rho ⁻	diese Arbeit
SEG15/A1	a his1, trp2	rho ^o	diese Arbeit
MS20/A1	α leu2-3, kar1-1 can ^r	rho ^o	H. Sakei, nicht publiziert
MS20[HS2-5631]	α leu2-3, kar1-1	rho ⁺ , mit ⁺	diese Arbeit
MS20[S1]	α leu2-3, kar1-1	rho ⁻	diese Arbeit

Tab.1 : Genotypen der in dieser Arbeit verwendeten Hefestämme

1.1.2 Medien

YD 1% (w/v) Hefeextrakt
3% (w/v) Glukose
2% (w/v) Agar für Plattenmedien

YG 1% (w/v) Hefeextrakt
3% (w/v) Glycerin
2% (w/v) Agar für Plattenmedien

WO 0.67% (w/v) Bacto-yeast nitrogen base ohne Aminosäuren
3% (w/v) Glukose
2% (w/v) Agar für Plattenmedien

YG + Paromomycin

2 mg Paromomycin wurde pro ml YG-Medium zugegeben

1.1.3 Wachstumsbedingungen

Für präparative Zwecke wurden die Stämme bei 30°C im jeweiligen Flüssigmedium in Inkubatoren geschüttelt. Agarplatten wurden je nach Versuchsbedingungen entweder in Brutschränken bei 30° bzw. 36°C inkubiert oder bei 23°C (Raumtemperatur) belassen.

1.2 *E. coli*

1.2.1 Verwendete Stämme :

JM101 : Δlac^- proAB, supE, thi⁻;
(F', proAB, traD36, lac^q Δ M15);
(Yanish-Perron et al., 1985)

SF8 : lop11, lig, supE, recB⁻, hsdS, leu⁻, thr⁻;
(Maniatis et al., 1982)

1.2.2 Medien

LB 1% (w/v) Trypton
 0.5% (w/v) Hefeextrakt
 0.5% (w/v) NaCl
 1.5% (w/v) Agar für Plattenmedien
 nach Bedarf : 100 µg/ml Ampicillin

M9 Angaben pro Liter :

 15 g Bacto-Agar

M9-Salze

 6 g Na₂HPO₄

 3 g KH₂PO₄

 0.5 g NaCl

 1 g NH₄Cl

Der Agar und die M9-Salze wurden getrennt autoklaviert. Nach dem Autoklavieren wurden folgende, steril filtrierte Lösungen zugegeben :

 1 ml MgSO₄ 1M

 0.1 ml CaCl₂ 1M

 1 ml Thiamin (10 mg/ml)

 5 ml Glukose (40%)

1.2.3 Wachstumsbedingungen

Flüssigkulturen wurden in Inkubatoren bei 37°C geschüttelt. Agarplatten wurden bei 37°C in Brutschränken bebrütet.

2. Plasmide und Vektoren

pUC19	Yanisch-Perron et al., 1985
M13 mp8	Messing et al., 1981 und 1983
M13 mp9	Messing et al., 1981 und 1983
M13 mp18	Messing et al., 1981 und 1983
M13 mp19	Messing et al., 1981 und 1983

3. Chemikalien und Enzyme

3.1 Feinchemikalien

Alle Chemikalien waren von höchstem Reinheitsgrad und wurden, falls nicht anders vermerkt, von der Firma Merck, Darmstadt bezogen.

Acrylamid	Serva, Heidelberg
Agarose	Sigma, St.Louis, USA
Ampicillin	Boehringer, Mannheim
Bisacrylamid	Serva, Heidelberg
CHX	Serva, Heidelberg
Ethidiumbromid	Sigma, St.Louis, USA
Ficoll	Sigma, St.Louis, USA
Formamid	Fluka, Buchs, Schweiz
Glukose	Hedinger, Stuttgart
Harnstoff	Fluka, Buchs, Schweiz
IPTG	Sigma, St.Louis, USA
Lysozym	Sigma, St.Louis, USA
Nukleotide	Boehringer, Mannheim
Medien zur Anzucht	Difco, Detroit, USA
Paromomycin	Parke-Davis, Freiburg
PEG	BDH, Poole, UK
Primer, 17mer	Boehringer, Mannheim
X-Gal	Boehringer, Mannheim
Xylencyanol	Serva, Heidelberg
Zymolyase	Seikagaku, Kogyo, Japan

3.2 Enzyme und Radiochemikalien

Die Radiochemikalien wurden von der Firma Amersham-Buchler bezogen. Restriktionsenzyme, DNA-modifizierende Enzyme und DNA-Polymerasen wurden von den Firmen Boehringer, Mannheim bzw. Renner, Dannstadt erhalten.

4. Abkürzungen

A	Adenosin
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar(e)
C	Cytosin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EB	Ethidiumbromid
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
EtOH	Ethanol
G	Guanosin
h	Stunde
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalaktosid
k b	Kilo-Basenpaare
kD	kilo-Dalton
(m)M	(milli) Molar
min	Minute
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
OD	Optische Dichte
Par	Paromomycin
PEG	Polyethylenglykol
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde
SDS	Natriumlaurylsulfat
T	Thymin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
U	Unit
UE	Untereinheit
V	Volt
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht/Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactopyranosid

II. METHODEN

A. GENETISCHE METHODEN

1. Kreuzungen

1.1 rho-Deletionskartierung

Diese Methode wurde verwendet, um die restriktive Mutation des Stammes KL14-4A genetisch zu kartieren.

Vor der Kreuzung wurden die zwei entsprechenden Stämme (d.h. jeweils ein rho-Stamm aus dem Stamm KL14-4A und die Mutante M5631) über Nacht in YD-Medium bei 30°C aktiviert. Aus jeder frühstationären Kultur wurden einige Tropfen auf eine WO-Platte aufgebracht, gemischt und bei 30°C inkubiert. Auf dem Minimalmedium mit Glukose haben nur diploide Zellen eine Wachstumsmöglichkeit, da die Kreuzungspartner so gewählt wurden, daß die Auxotrophien in ihren Zygoten kompensiert werden können. Nach zwei Tagen wurden die Zellen von der WO-Platte mit einer Impföse in ca. 10 ml flüssiges WO-Medium überimpft und bei 30°C ohne Schütteln inkubiert. Die Zellpopulation wurde bis zur zwölften Generation gezüchtet. In dieser Zeit konnten die heterogenen mitochondrialen Genome segregieren, es entstand eine Population homoplasmischer Zellen.

Aus dieser Kultur wurden Zellen entnommen und auf WO-Platten ausgestrichen. Dabei wurde die Kultur nicht bis zum erwünschten Titer verdünnt, sondern Zellen mit einer Impföse entnommen und auf Einzelkolonien ausgestrichen (ca. 100 Zellen pro Platte).

Diese WO-Platten wurden für ca. vier Tage bei 30°C inkubiert, bis die Kolonien einen Durchmesser von 3-5 mm besaßen. Die Kolonien wurden dann mit sterilen Samttüchern und einem Stempelblock auf drei YG-Platten replikagestempelt. Diese YG-Platten wurden anschließend bei 23°C (Raumtemperatur), 30°C bzw. 36°C für eine Woche inkubiert.

1.2 mit- x rho- Kartierung

Punktmutanten, deren Mutationen bereits in verschiedenen Strukturgenen des mitochondrialen Genomes lokalisiert waren, wurden jeweils mit einem selektierten rho-Stamm auf WO-Platten gekreuzt. Konnten die Nachkommen auf YG-Platten wachsen, d.h. traten Wildtyp-Rekombinanten auf, so bedeutet dies, daß das Genom des rho-Stammes die Wildtypinformation zur entsprechenden mit-Mutation zurückbehalten hat.

1.3 kar-Kreuzung

Diese Methode wird verwendet, um das mitochondriale Genom eines haploiden Stammes in einen anderen Paarungstyp zu transferieren.

Als Kreuzungspartner wurde dabei der Hefestamm MS20 herangezogen, der eine rezessive Mutation (kar1-1) im Kerngenom trägt, welche bei der Diploidisierung mit einem anderen Stamm die Fusion der zwei Kerne hemmt. Dieser diploide Zustand ohne Kernfusion ist instabil, sodaß die Kerne wieder in zwei Zellen segregieren, wobei diese eine Mischpopulation der Mitochondrien aufweisen können. Durch Segregation kann eine homoplasmische Mitochondrienpopulation entstehen (Conde und Fink, 1976; Lancashire und Matton, 1979).

Oben beschriebene Cytoduktionseigenschaft wurde benützt, um das Mitochondriengenom eines haploiden Stammes in einen anderen Paarungstyp zu transferieren : so kann z.B. durch die Kreuzung α HS2-5631 x α MS20 [rho^o] ein MS20-Stamm isoliert werden, der das mitochondriale Genom des Stammes HS2-5631 besitzt.

Für die kar-Kreuzung wurden die entsprechenden Stämme in YD-Medium aktiviert. Aus jeder Kultur wurden einige Tropfen auf eine YD-Platte aufgebracht und vermischt. Nach 10-stündiger Inkubation bei 30°C wurden die Zellen auf WO + Leu (für MS20-Selektion) mit einer Impföse auf Einzelkolonien ausgestrichen und bei 30°C für drei bis vier Tage bebrütet. Diese Platten wurden auf WO gestempelt, um zwischen Diploiden und Haploiden unterscheiden zu können. Weiterhin wurden die Kolonien dieser Platten

auf entsprechende Mitochondrienmarker getestet.

2. rho-Induktion mit Ethidiumbromid

Der atmungskompetente Wildtypstamm KL14-4A wurde in YD-Medium angezüchtet, die Zellen in der frühstationären Phase geerntet, einmal mit H₂O gewaschen und in Phosphatpuffer (0.1 M pH 6.5) aufgenommen (Titer $1-2 \times 10^6$ Zellen/ml).

Eine Stunde lang wirkte Cycloheximid (10 µg/ml) auf die Zellsuspension, um nicht wachsende Bedingungen herzustellen. Die mutagene Behandlung begann durch Zugabe von EB in den gewünschten Konzentrationen (40 µg/ml bis 400 µg/ml). Nach 2-12 h Mutagenese bei 23°C bzw. 30°C wurden die Zellen zweimal mit sterilem H₂O gewaschen und entweder sofort oder erst nach Ablauf einer von Fall zu Fall unterschiedlich gewählten Segregationszeit auf YD-Medium ausplattiert.

Nach 3-5 Tagen Bebrütung (30°C) wurden die Kolonien mit sterilen Zahnstochern auf Mikrotiterplatten überimpft und in je 50 µl YD-Medium über Nacht bei 30°C inkubiert. Die Analyse der von den jeweiligen rho-Stämmen zurückbehaltenen Genomanteile erfolgte wie unter B 4.1.7 beschrieben.

3. Test auf Paromomycinresistenz

In diesem Test sollte untersucht werden, ob die "leaky" und "reduziert leaky" wachsenden Zellen aus Kapitel I einen Paromomycin-resistenten Phänotyp zeigten. Da nur atmungskompetente Zellen auf Par-YG-Platten gut wachsen, wurden Wildtyprevertanten der Rasterschubmutation M5631 isoliert, welche die leaky und reduziert leaky wachsenden Zellen trugen. Die Reversion findet in diesen Zellen spontan mit einer Häufigkeit von ca. 10^{-3} statt; Revertanten der M5631 Mutation können daher leicht auf YG-Medium isoliert werden.

Die atmungskompetenten Revertanten wurden in YG-Medium in Mikrotiterplatten hochgezogen und anschließend auf Par-YG-Platten gestempelt.

B. BIOCHEMISCHE METHODEN

1. Isolierung von Mitochondrien

Zur Gewinnung von Mitochondrien wurden die Hefezellen 15 h in YD-Medium bis zur frühen stationären Phase (1×10^8 Zellen/ml) unter Rühren bei 30°C hochgezogen.

Die Isolierung der Mitochondrien wurde nach der Methode von Lang et al. (1977) durchgeführt. Die Zellen wurden dabei in Sorbitolpuffer (0.6 M) mit Hilfe von Glasperlen bis zu einer Ausbeute von 60-80% aufgeschlossen.

Bei einem Teil der Hefestämme erfolgte die Protoplastierung der Zellen enzymatisch mit Zymolyase (Lewin et al., 1978). Durch differentielle Zentrifugationen ließen sich die Mitochondrien nach einigen Waschschritten bei 20.000 rpm pelletieren.

Sorbitolpuffer : 0.6 M Sorbitol
10 mM Tris-HCl, pH 7.4
1 mM EDTA

1.1 Gewinnung mitochondrialer DNA

Die unter 1. erhaltenen Mitochondrien wurden mit SDS (Endkonzentration 2%) lysiert, anschließend wurde NaCl bis zu einer Endkonzentration von 1 M zugegeben und nach 1 h auf Eis das Proteinpräzipitat bei 15.000 rpm abzentrifugiert. Der die Nukleinsäuren enthaltende Überstand wurde 1 h mit Proteinase K (10 µg/ml) bei 37°C inkubiert.

Die Entfernung von RNA und Kern-DNA ließ sich durch CsCl-Dichtezentrifugation (CsCl-Lösung von 1 g CsCl pro ml Lösung und 1 µg/ml Bisbenzimid) erreichen (50.000 rpm; 20°C für 24 h). Die mitochondriale DNA-Bande (oben) wurde mit einer Spritze entnommen, 1:1 mit TE verdünnt und mit 2-fachem Volumen Ethanol bei 4°C für 30 min gefällt.

Das erhaltene Pellet wurde dann in TE-Puffer resuspendiert und erneut mit Ethanol und 0.3 M Natriumacetat (pH 5.5) gefällt. Nach

Zentrifugation (10.000 rpm, für 10 min bei 4°C) wurde die mitochondriale DNA in entsprechenden Volumen TE suspendiert.

TE-Puffer : 10 mM Tris
 1 mM EDTA
 pH 8

1.2 Gewinnung mitochondrialer RNA

Die unter 1. erhaltenen Mitochondrien wurden in TE-Puffer aufgenommen und mit SDS (Endkonzentration 2%) lysiert. Anschließend erfolgte die Extraktion der mitochondrialen RNA durch Phenolbehandlung des Lysates nach der Methode von Locker (1979). Dabei erwies sich eine 5-malige Phenolextraktion als ausreichend. Wässrige und phenolische Phase (Phenol : Chloroform im Verhältnis 1:1) wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und fünf Minuten lang heftigst geschüttelt. Die Abtrennung der wässrigen von der phenolischen Phase erfolgte durch Zentrifugation (10.000 rpm für 5 min).

Nach der fünften Phenolextraktion wurde die wässrige Phase einmal mit Chloroform extrahiert und anschließend mit zwei Volumen Ethanol und Natriumacetat (Endkonzentration 0.3 M; pH 5) gefällt. Falls die mitochondriale RNA sofort weiterverwendet werden sollte, wurde das Pellet in TE-Puffer aufgenommen. Für eine längere Aufbewahrungszeit erfolgte eine zweite Ethanol-fällung, die ethanolische Lösung wurde anschließend bei -20°C aufbewahrt.

2. Gewinnung von Plasmid und Phagen-DNA aus *E. coli*

2.1 Gewinnung von Plasmid-DNA und doppelsträngiger Phagen-DNA aus *E. coli*

Die Minipräparation der Plasmid-DNA bzw. der doppelsträngigen Phagen-DNA (M13) erfolgte nach der von Maniatis et al. (1982)

modifizierten, alkalischen Lysis-Methode nach Birnboim und Doly (1979).

2.2 Gewinnung von einzelsträngiger Phagen-DNA (M13)

Während für die Klonierung doppelsträngige Phagen DNA benötigt wird, braucht man für die Sequenzierung nach Sanger (1977, 1980) einzelsträngige DNA. Diese Einzelstrang-DNA liegt in M13-Phagen vor, welche aus Bakterien ausgeschleust werden (M13 ist kein lysierender Phage) und kann deshalb sehr einfach isoliert werden.

Dazu wurden 2 ml LB-Medium mit einem weißen Plaque (M13-Phage mit inseriertem DNA-Fragment, siehe 3.4.2) und einem Tropfen einer JM101 Übernachtskultur angeimpft und 8-13 h bei 37°C geschüttelt. 1.5 ml der Kultur wurden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und 5 min in einer Eppendorfsentrifuge zentrifugiert (10.000 rpm). Vom Überstand wurde ca. 1 ml abgenommen, mit 300 µl PEG (20%), 2.5 M NaCl gemischt und 15 min bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Phagen 5 min in der Eppendorfsentrifuge abzentrifugiert und der Überstand mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Um auch die letzten Reste des zähen PEG-Überstandes zu entfernen, wurde noch einmal kurz (30 sec) zentrifugiert und die verbliebene Flüssigkeit mit einer ausgezogenen Pasteurpipette abgenommen. Das Phagenpellet wurde in 100 µl TE gelöst und mit 50 µl Phenol (gesättigt mit TE) phenolisiert. Die wässrige Phase wurde sorgfältig abgenommen und mit 10 µl Natriumacetat (3 M), pH 5.5 und 300 µl Ethanol bei -80°C für 1 h gefällt.

Die DNA wurde bei 4°C abzentrifugiert (10.000 rpm, 10 min) und das Pellet mit 80% Ethanol gewaschen. Das getrocknete Pellet wurde in 40 µl sterilem H₂O gelöst.

TE-Puffer : 10 mM Tris-HCl
 1 mM EDTA
 pH 8

3. Klonierungsmethoden

3.1 Restriktion von DNA

Der Restriktionsverdau wurde nach den jeweiligen Vorschriften der Enzymhersteller durchgeführt (0.1-1 µg DNA/10 µl Reaktionsansatz).

Der Reaktionsstop erfolgte durch Zusatz von 1/3 Volumen Auftragspuffer. Die Auftrennung der Restriktionsfragmente ließ sich durch horizontale 0.6-1.5%-ige Agarosegele erreichen (G. Grosch, 1980).

Auftragspuffer : 10 mM Tris-HCl, pH 7.4
10 mM EDTA
0.7% Bromphenolblau

3.2 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

3.2.1 Elektroelution

Der Bereich des Geles, der die zu eluierende DNA-Bande enthält, wurde herausgeschnitten, zusammen mit ca. 400 µl 1 x TBE Puffer in einen Dialyseschlauch überführt und in einer Elektrophoresewanne, die mit 1 x TBE Puffer gefüllt war bei 150 V eluiert. Da die DNA vorher mit EB angefärbt worden war, konnte der Verlauf der Elution unter einer UV-Lampe verfolgt werden.

Nach Abschluß der Elution wurde kurz umgepolt (30 sec), die DNA mit einer Pasteurpipette aus dem Dialyseschlauch entfernt und mit 1/10 Vol Natriumacetat (3 M, pH 5.5) sowie 2.5 Vol Ethanol gefällt (-80°C, 15 min).

20 x TBE-Puffer : 1.8 M Tris-HCl
70 mM EDTA
pH 8.3

3.2.2 "Biotrap"-Methode

Die "Biotrap"-Apparatur wurde nach den Angaben des Herstellers (Schleicher und Schüll) zusammengebaut, das Agarosestück mit der DNA in die Elutionskammer gelegt und mit 1 x TBE Puffer überschichtet. Die "Biotrap"-Apparatur wurde dann in eine mit 1 x TBE Puffer gefüllte Elektrophoresewanne gestellt und die DNA mit 200 V in eine Membranfalle eluiert. Nach Beendigung der Elution, die auch hier mit einer UV-Lampe überwacht werden konnte, wurde kurz umgepolt, die DNA-Lösung aus der Membranfalle pipettiert und mit 1/10 Vol Natriumacetat (3 M, pH 5.5) und 2.5 Vol Ethanol gefällt (-80°C, 15 min).

3.3 Ligationen

Für Klonierungen wurden für die Ligationen 0.05-0.1 µg Vektor- und 0.02-0.05 µg Fragment-DNA eingesetzt (molares Endenverhältnis Vektor : Fragment = 1:5 bis 1:10). In einem Volumen von 20 µl wurde der Reaktionsansatz nach Zugabe von 0.3 U (Ligation überhängender Enden), bzw. 1 U (Ligation glatter Enden) Ligase über Nacht bei 15°C inkubiert. Alternativ (bevorzugt bei Ligationen glatter Enden) wurde die Reaktion auch für 3-4 h bei 25°C durchgeführt.

5 x Ligationspuffer :	250 mM Tris-HCl, pH 7.4
	50 mM MgCl ₂
	25% (w/v) PEG 8000
	5 mM DTT
	5 mM ATP

3.4 Transformation von *E. coli*

3.4.1 Herstellung kompetenter Zellen

0.5 ml einer Übernachtskultur des jeweiligen Stammes wurde 1:100 in LB-Medium verdünnt und bis zu einer OD₆₀₀ = 0.4-0.6

angezüchtet. Die Zellen wurden bei 4°C abzentrifugiert, in 20 ml 0.1 M eiskaltem CaCl₂ aufgenommen, für 15 min bei 4°C inkubiert und anschließend erneut abzentrifugiert.

Nach Aufnehmen in 2 ml eiskaltem 0.1 M CaCl₂ wurden die Zellen vor Zugabe des Ligationsansatzes für 15 min bei 4°C belassen.

3.4.2 Transformation von M13-Vektoren in *E. coli* JM101 (Messing et al., 1983)

Gewöhnlich wurden 1 µl bzw. 10 µl des Ligationsansatzes mit je 200 µl kompetenten *E. coli* Zellen überschichtet und vorsichtig gemischt. Nach 40 min auf Eis wurden die Ansätze für 3 min bei 42°C inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch mit 3 ml Topagar (LB-Weichagar 1.5%), 40 µl IPTG (20 mg/ml) und 40 µl X-Gal (2% in Dimethylformamid) auf LB-Platten gegossen.

Nach ca. 12 h ließen sich blaue (kein Insert) und weiße (mit Insert) Plaques auf den Platten unterscheiden.

3.4.3 Transformation von pUC19-Plasmiden in *E. coli*

In der Regel wurden 4 µl eines Ligationsansatzes mit 16 µl TE-Puffer versetzt, mit 50 µl kompetenten *E. coli* Zellen überschichtet und vorsichtig gemischt. Nach 30 min auf Eis wurden die Ansätze für 2 min bei 42°C im Wasserbad erhitzt und anschließend 5 min auf Eis abgekühlt. Dann wurde 1 ml LB-Medium zugegeben und zur Ausprägung der Ampicillinresistenz 1 h bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden 30 sec in der Tischzentrifuge pelletiert, in 400 µl LB-Medium gelöst und davon je ca. 100-200 µl auf LB-Platten mit Ampicillin (100 µg/ml) ausplattiert. Den Agarplatten wurden dabei 40 µl X-Gal (2% in Dimethylformamid) und 40 µl IPTG (20 mg/ml) zugesetzt.

4. Markierung und Analyse von Nukleinsäuren

4.1 DNA

4.1.1 5'-Endmarkierung (Maxam & Gilbert, 1980)

Nach Abspaltung des 5'-Phosphatrestes mit alkalischer Phosphatase wurde das DNA-Fragment mit T4-Polynukleotidkinase in Anwesenheit von γ -[^{32}P]ATP rephosphoryliert.

a) Dephosphorylierung :

Die Entfernung des 5'-Phosphatrestes erfolgte nach der Methode von Maniatis et al. (1982) mit 5 U CIP ("Calf intestine alkaline phosphatase") pro 20 pmol freier Enden.

b) Phosphorylierung zurückversetzter oder glatter Enden :

Das dephosphorylierte DNA-Fragment wurde in 40 μl Denaturierungspuffer bei 90°C für 2 min denaturiert und anschließend eiskühlt. Danach wurden 5 μl Kinase-A-Puffer (5 x) und 250 μCi γ -[^{32}P]ATP (3000 Ci/mmol) zugegeben. Die Reaktion (50 μl Ansatz) erfolgte durch Zugabe von 20 U T4-Polynukleotidkinase für 30 min bei 37°C und wurde mit 10 μl EDTA (100 mM) gestoppt. Nach Extraktion mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) wurde die wässrige Phase einmal mit Ethanol gefällt.

Denaturierungspuffer : 20 mM Tris-HCl, pH 8.5
 0.1 mM EDTA
 1 mM Spermidin

5 x Kinasepuffer : 500 mM Tris-HCl, pH 9.5
 100 mM MgCl_2
 50 mM DTT
 50% Glycerol

4.1.2 3'-Endmarkierung mit Terminaler Transferase

Terminale Transferase vermag an 3'-Enden einzel- oder doppelsträngiger DNA Desoxynukleotide zu transferieren (Maniatis et al.,

1982). Durch Verwendung von radioaktiv markierten Didesoxynukleotiden ist es möglich, nur ein einziges Nukleotid an das 3'-Ende zu synthetisieren und somit das jeweilige DNA-Fragment spezifisch an seinen 3'-Enden zu markieren.

In einem 50 µl Ansatz wurden 25 µl Terminaler Transferasepuffer (2 x), 5 µl α -[^{32}P]ddATP (5000 Ci/mmol), 10 U Terminale Transferase und 2-5 µg des jeweiligen DNA-Fragmentes (in 20 µl H_2O gelöst) eingesetzt. Die Reaktion erfolgte für 1 h bei 37°C und wurde durch Zugabe von 2 µl 0.5 M EDTA gestoppt. Nach einmaliger Phenolextraktion wurde die DNA mit Ethanol gefällt.

2 x Transferasepuffer :	0.4 M Natriumcacodylat
	50 mM Tris-HCl, pH 6.9
	4 mM DTT
	1 mM CoCl_2
	500 µg/ml BSA

4.1.3 3'-Endmarkierung von Restriktionsfragmenten mit überstehenden 5'-Enden

Zur 3'-Endmarkierung von doppelsträngigen DNA-Fragmenten mit überstehenden 5'-Enden wurde das Klenow-Fragment der *E. coli* DNA-Polymerase verwendet.

Die Endmarkierung wurde nach der Vorschrift von Maniatis et al. (1982) durchgeführt.

4.1.4 Strangtrennung von doppelsträngiger DNA

Falls endmarkierte doppelsträngige DNA-Fragmente als Hybridisierungsproben für S1-Kartierungen verwendet werden sollten, wurde nach erfolgter Endmarkierung eine Strangtrennung durchgeführt. Diese erfolgte nach der Methode von Maniatis et al. (1982). Die Einzelstränge wurden dabei, je nach Länge des DNA-Fragmentes, in 5-8%-igen Acrylamidgelen aufgetrennt.

4.1.5 Nicktranslation

Die Markierung der DNA mit α -[^{32}P]dATP und DNA-Polymerase erfolgte nach der Methode von Rigby et al. (1977), modifiziert nach der Anleitung der Firma Amersham-Buchler, deren Nick-translations-Kit für die Markierung der DNA-Fragmente verwendet wurde.

Zur Abtrennung nicht eingebauter Nukleotide wurde der Reaktionsansatz (50 μl) mit 200 μl Ammoniumacetat (2.5 M) und 140 μl Isopropanol bei -20°C für 30 min gefällt und abzentrifugiert (10.000 rpm, 15 min). In der Regel wurde das Vacuum-getrocknete DNA-Pellet anschließend in 100 μl TE-Puffer aufgenommen.

4.1.6 "Southern"-Analyse von DNA-Fragmenten

Der Transfer von DNA-Fragmenten auf Nitrocellulose, sowie die Hybridisierung der gebundenen DNA mit ^{32}P -markierter, nick-translatierter DNA erfolgte nach der von Southern (1975) publizierten Methode.

4.1.7 "Dotblothybridisierung" von Hefe-rho-Kolonien

Diese Methode wurde verwendet, um zu bestimmen, welche Genomanteile in verschiedenen rho-Stämmen des Mutterstammes KL14-4A zurückbehalten worden waren (siehe Kapitel I).

Einzelkolonien der zu untersuchenden Klone wurden in Mikrotiterplatten, gefüllt mit Vollmedium (1% Hefeextrakt, 5% Glukose), suspendiert und die Zellen über Nacht bebrütet.

Von den stationären Zellkulturen wurde das verbrauchte Medium mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt und die Hefen durch Zugabe von frischem Medium innerhalb von 1.5 h bei 30°C aktiviert. Ein Replika der Zellen wurde jeweils durch Überstempeln der Kolonien auf Vollmedienplatten erhalten. Nach 1.5 h wurde das Aktivierungsmedium wieder abgesaugt, die Zellen mit je 50 μl Protoplastierungslösung versetzt und nach Suspension mit einem Plexiglasstempel für 1-2 h bei 37°C inkubiert. Die Lyse und Dena-

turierung der Zellen erfolgte durch Zugabe von je 10 µl SDS (7%) und NaOH (3.5 M). Das Lysegemisch wurde gut mit einem Plexiglasstempel gerührt und für 30 min bei RT belassen.

Inzwischen konnten die Nitrocellulosefilter mit 3 x SSC getränkt und anschließend getrocknet werden. Die DNA wurde mit einem Plexiglasstempel auf die vorbehandelte Nitrocellulose transferiert, für 5 min bei 37°C getrocknet und die NaOH durch 5-minütiges Waschen in 3 x SSC entfernt. Nach Backen der Filter bei 80°C für 2 h wurden diese entweder sofort für eine DNA/DNA-Hybridisierung (siehe 4.1.6) eingesetzt oder bei -20°C für einen späteren Gebrauch aufbewahrt.

Protoplastierungslösung : 0.6 M Sorbitol
0.3% β-Mercaptoethanol
3 mg/ml Zymolyase (20.000)

20 x SSC : 3 M NaCl
0.3 M Natriumcitrat

4.1.8 Sequenzierung nach der Kettenabbruchmethode von Sanger (1977)

Die Sequenzierung der in die jeweiligen M13-Vektoren einklonierten DNA-Fragmente erfolgte entsprechend der Didesoxy-Kettenabbruchmethode nach Sanger et al. (1977), modifiziert nach dem Sequenaseprotokoll der Firma USB (Tabor und Richardson, 1987).

Als Primer wurden synthetische Oligonukleotide verschiedener Länge verwendet (17-27mer). Der 10 µl Reaktionsansatz (nach Tabor und Richardson, 1987) wurde in einer ausgezogenen Glaskapillare aufgenommen und anschließend beide Enden der Kapillare zugeschweißt. Nach 10-minütigem Erhitzen auf 100°C kühlten die Proben über Nacht ab. Die Sequenzreaktionen erfolgten nach dem Sequenaseprotokoll der Firma USB (Tabor und Richardson, 1987). Die Auftrennung der einzelsträngigen DNA-Ketten wurde in Acrylamidgelen (0.03 x 60 x 20 cm) mit unterschiedlichen Acrylamidkonzentrationen (5-8%) bei 2000 V (maximal 45 Watt) durchgeführt. Autoradiogramme entstanden durch verschiedenen

lange Exposition von Kodak X-O-Mat Röntgenfilmen auf den getrockneten Gelen.

4.2 RNA

4.2.1 rRNA

4.2.1.1 Bestimmung der 5'-Enden von 15 S rRNAs durch S1-Kartierung

Hierbei wurde nach dem Protokoll von Bonitz et al. (1982) vorgegangen.

4.2.2 tRNA

4.2.2.1 Isolierung und Reinigung von tRNAs

Die gefällte, gesamt-mitochondriale RNA (siehe B 1.2) wurde in 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) und 0.3 M NaCl aufgenommen. Die RNA-Lösung wurde anschließend auf eine DEAE-Cellulose-Säule geladen, die vorher mit dem gleichen Puffer equilibriert worden war. Die mitochondriale tRNA wurde mit 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) und 1.5 M NaCl eluiert und anschließend ethanolpräzipitiert.

4.2.2.2 Markierung von tRNAs durch tRNA-Nukleotidyltransferase

Die tRNA-Nukleotidyltransferase synthetisiert das CCA-Trinukleotid an das 3'-Ende von tRNAs. Durch Zugabe von α -[^{32}P]ATP ist es daher möglich, tRNAs an ihren 3'-Enden radioaktiv zu markieren. Zu 2-3 μg gesamt tRNA (in 22 μl H_2O) wurden 0.5 μl CTP (1 mM), 2 μl α -[^{32}P]ATP (400 $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$), 3 μl Transferasepuffer (10 x) und 2.5 μl tRNA-Nukleotidyltransferase (6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, erhalten von Dr. P. Guillemaut) gegeben.

Der Reaktionsansatz (30 μl) wurde für 30 min bei 37°C inkubiert.

Anschließend erfolgte eine Phenolextraktion. Die wässrige Phase wurde einmal ethanolgefällt und in 10 μ l TE aufgenommen. Nach Zugabe von 10 μ l Auftragspuffer erfolgte die Auftrennung der markierten tRNAs wie unter 4.2.2.3 beschrieben.

10 x Transferasepuffer :	300 mM Tris-HCl, pH 8.5
	100 mM MgCl ₂
	80 mM DTT
2 x Auftragspuffer :	1% Xylencyanol
	60% Saccharose
	2.5 mM EDTA
	10 mM Natriumacetat, pH 4.5
	8 M Harnstoff

4.2.2.3 Zweidimensionale Gelelektrophorese

Hierbei wurde nach dem Protokoll von Martin et al. (1977) vorgegangen. Die tRNAs wurden nach der Auftrennung, wie unter 4.2.2.4 beschrieben, aus dem 2D-Gel eluiert.

4.2.2.4 Elution von tRNAs aus Acrylamidgelen

Die Gelstückchen, welche die radioaktiv markierten tRNAs enthielten, wurden zerdrückt und in Eppendorftubes überführt, in welche zuvor 300 μ l SDS-Puffer und 150 μ l Phenol pipettiert worden waren. Nach 20-stündigem Schütteln bei Raumtemperatur wurde die wässrige Phase zunächst phenolextrahiert, mit Ether gewaschen und anschließend einmal mit Ethanol gefällt.

SDS-Puffer :	0.5 M Ammoniumacetat
	0.01 M Magnesiumacetat
	1 mM EDTA
	0.1% SDS

4.2.2.5 tRNA Sequenzierung - Bestimmung von Basenmodifikationen

Die chemische Sequenzierung erfolgte nach der Vorschrift von Peattie (1979), die enzymatische Spaltung mit T₁-Nuklease nach Donis-Keller et al., (1977).

Die tRNA-Spaltfragmente aus chemischer und enzymatischer Sequenzierung wurden auf Acrylamidgelen (0.05 x 30 x 60 cm) verschiedener Konzentrationen (10-15%) aufgetrennt. Zur Bestimmung von Basenmodifikationen siehe Text (Kapitel III).

4.2.2.6 S1-Kartierung zur Bestimmung der 5'- und 3'-Enden von tRNAs

Die S1-Kartierung zur Bestimmung der 5'- und 3'-Enden von tRNAs wurde nach dem Protokoll von Bonitz et al. (1982) durchgeführt.

4.2.2.7 Northernanalyse von tRNAs

a) denaturierendes Harnstoff-Acrylamidgel :

Die, wie unter 4.2.2.1 beschrieben, angereicherten tRNAs wurden in einem 10%-igen Acrylamidgel (8 M Harnstoff) aufgetrennt und anschließend durch Elektrophoretoblotting auf Nylonfilter der Marke Zeta-Probe oder Gene Screen Plus, entsprechend der Trans-Blot Cell Operating Vorschrift der Firma Bio-Rad (Richmond, CA 94804), transferiert.

b) natives Acrylamidgel :

Alternativ dazu wurden tRNAs in einem 10%-igen Acrylamidgel ohne Harnstoff aufgetrennt und, wie oben beschrieben, auf Zeta-Probe Papier transferiert. Die Hybridisierung der transferierten tRNAs mit nicktranslatierten DNA-Proben erfolgte in den Fällen a) und b) nach der Trans-Blot Vorschrift der Firma Bio-Rad (Richmond, CA 94804).

4.2.2.8 Aminoacylierung von tRNAs

Die Aminoacylierung von tRNAs wurde mit ^3H -markiertem Serin, bzw. ^3H -markiertem Tyrosin nach der Methode von Schneller (1977) durchgeführt, wobei für die Acylierung *E. coli* Synthetasen verwendet wurden (erhalten von Dr. R. Martin).

5. Analyse mitochondrialer Proteine

5.1 $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ -Markierung mitochondrialer Proteine

Die Markierung der mitochondrialen Proteine mit $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ (200 $\mu\text{Ci/ml}$) erfolgte nach der Methode von Douglas und Butow (1976), die Isolierung der Mitochondrien mit Hilfe von Glasperlen nach dem Protokoll von Needleman und Tzagoloff (1975).

5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die in H_2O suspendierten Mitochondrien wurden durch 2-minütiges Kochen in Dissoziationspuffer (SDS-Endkonzentration 5%) gelöst und in die Taschen des Sammelgels (Länge 4 cm) eines SDS-Plattengelsystems aufgetragen. Es wurde das von Lämmli (1970) beschriebene diskontinuierliche Puffersystem verwendet.

Die Trenngele (0.1 x 20 x 15 cm) wiesen einen exponentiellen Gradienten der Acrylamidkonzentrationen von 10% (oben) bis 15% (unten) auf (Douglas und Butow, 1976). Die Auftrennung der Proteine erfolgte über Nacht bei einer Spannung von 70 V. Die Gele wurden anschließend in einem Geltrockner auf Filterpapier getrocknet. Autoradiogramme entstanden durch verschieden lange Expositionen von Kodak X-O-Mat Röntgenfilmen auf den trockenen Gelen.

5.3 Mengenbestimmung mitochondrialer Proteine

Zur Abschätzung der Mengen der jeweiligen mitochondrialen Proteine wurden die Autoradiogramme der Proteingele in einem LKB Ultrascan Laser Densitometer untersucht. Dabei wurde der Schwärzungsgrad der einzelnen Proteinbanden in den Autoradiogrammen mit Hilfe eines Laserstrahles densitometrisch bestimmt, und so auf die jeweilige Proteinmenge geschlossen (als interner Standard wurde die Menge an Var1-Protein herangezogen).

KAPITEL I:

ANALYSE EINER RESTRIKTIVEN MUTATION, WELCHE DIE SPONTANE RASTERSCHUBSUPPRESSION DER RASTERSCHUBMUTANTE M5631 REDUZIERT

Einführung

Die mitochondriale Rasterschubmutante M5631 ist in der Lage, ihre Rasterschubmutation im *oxi1*-Gen spontan (d.h. nicht auf Grund einer Zweitmutation ihres mitochondrialen Genomes) in einem gewissen Ausmaß zu supprimieren. Diese Zellen sind daher nicht völlig atmungsdefekt, sondern zeigen ein sogenanntes "leaky Wachstum" auf nicht vergärbaren Substraten.

Es stellte sich nun die Frage, ob die mitochondrialen Genome anderer Hefestämme ebenfalls die Fähigkeit zur spontanen Rasterschubsuppression besitzen, oder ob hier stammspezifische Unterschiede beobachtet werden können. Tatsächlich trifft letzteres zu. Das mitochondriale Genom des Wildtypstammes KL14-4A ist in einem weit geringeren Ausmaß zur spontanen Rasterschubsuppression befähigt, als das des Stammes M5631. Weiss-Brummer et al. (1987) konnten zeigen, daß die Ursache dafür im Gen der mitochondrialen 15S rRNA des Stammes KL14-4A liegt. Wird nämlich dieser Genbereich mittels Rekombination in das mitochondriale Genom der Rasterschubmutante M5631 integriert, so tritt eine erhebliche Reduzierung der spontanen Rasterschubsuppression dieses Stammes auf. Dies führt dazu, daß solche rekombinanten Zellen schwächer wachsen als die Originalmutante M5631 ("leaky" → "reduziert leaky"), da auf Grund der reduzierten Rasterschubsuppression weit weniger *oxi1*-Genprodukt gebildet wird (das *oxi1*-Gen stellt jenes Gen dar, in welchem die Rasterschubmutation der Mutante M5631 lokalisiert ist).

Die molekulare Ursache für die Verminderung der spontanen Rasterschubsuppression in rekombinanten Zellen, welche die 15S rRNA des Stammes KL14-4A enthalten, sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden. Dies ließe sich durch einen Sequenzvergleich der 15S rRNA Region der Stämme KL14-4A und M5631 relativ einfach bewerkstelligen, unter der Voraussetzung, daß die

Stämme isogene mitochondriale Genome besitzen. Ein im Vergleich zur 15S rRNA Sequenz des Stammes M5631 gefundene Basenaustausch sollte Aufschluß über die "restriktive Mutation" im Stamm KL14-4A geben, welche die Reduzierung der spontanen Rasterschubsuppression bewirkt.

Da aber die Stämme KL14-4A und M5631 nicht isogene mitochondriale Genome besitzen, waren - unabhängig von der restriktiven Mutation - eine Vielzahl von Sequenzunterschieden auf Grund von Stammpolymorphismen zu erwarten. Dies erschwert eine eindeutige Identifizierung der restriktiven Mutation. Deshalb war es zunächst notwendig, den Mutationsort im Stamm KL14-4A mit genetischen Mitteln einzugrenzen.

Eine probate Methode, um diese Mutation im Stamm KL14-4A genetisch zu lokalisieren, ist die Isolierung und Charakterisierung von rho--Deletionsstämmen aus diesem Stamm (zur rho--Deletionskartierung siehe auch Material und Methoden). Als rho--Stämme werden solche Stämme bezeichnet, welche sich durch den partiellen Verlust ihrer mitochondrialen Genome auf Grund umfangreicher Deletionen auszeichnen. Dieser Verlust kann dabei fast das ganze Genom betreffen, sodaß in einem Fall ein nur 70bp langes Genomfragment erhalten blieb (Fangman und Dujon, 1984). Verbliebene Genomanteile werden oft in Palindrom- oder Tandemform reiteriert, sodaß rho--Genome schließlich die Größe des rho+-Genomes erreichen können.

Ziel war es nun, aus dem rho+-Stamm KL14-4A rho--Stämme zu isolieren, die nur noch Teilbereiche des 15S rRNA Genes enthielten. Nach Integration der jeweiligen rho--Genomfragmente in das mitochondriale Genom der Rasterschubmutante M5631 mittels Rekombination sollte dann nur der rho--Stamm eine Reduzierung der Rasterschubsuppression verursachen, dessen Genomanteil die restriktive Mutation zurückbehalten hatte (Abb.3).

Absicht dabei war, die Mutation einem definierten Bereich des 15S rRNA Genes des Stammes KL14-4A zuzuordnen. Anschließend sollte diese Region des 15S rRNA Genes von Mutante M5631 und KL14-4A auf Sequenzebene untersucht werden, um den Basenaustausch der restriktiven Mutation zu identifizieren.

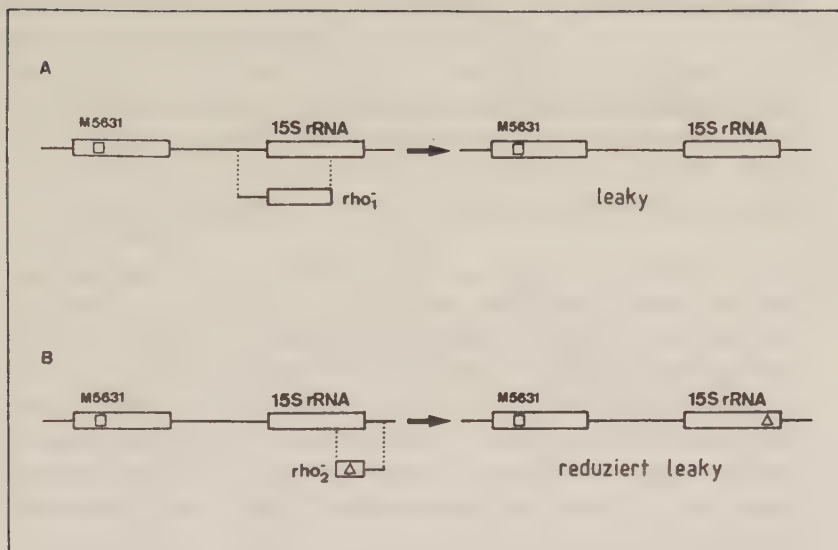


Abb.3 : Kreuzung von rho⁻-Stämmen, abgeleitet aus dem rho⁺-Stamm KL14-4A, mit der Rasterschubmutante M5631

A) Der rho⁻-Stamm enthält die restriktive Mutation nicht; alle rekombinanten Nachkommen wachsen leaky auf nicht vergärbaren Medien.

B) Der rho⁻-Stamm enthält die restriktive Mutation (Δ); rekombinante Nachkommen dieser Kreuzung wachsen auf Grund verminderter Rasterschubsuppression reduziert leaky auf nicht vergärbaren Medien.

Ergebnisse

1. Isolierung geeigneter rho-Stämme der 15S rRNA Region aus dem rho⁺-Stamm KL14-4A

1.1 Isolierung und Analyse des rho-Stammes KLA13

Die Induktion und Isolierung unterschiedlicher rho-Stämme aus dem rho⁺-Stamm KL14-4A erfolgte durch Ethidiumbromidbehandlung der Zellen, wie in Material und Methoden beschrieben. In einer "Dot blot-Analyse" (siehe Material und Methoden) wurde die mitochondriale DNA der jeweiligen rho-Stämme auf Nitrocellulose transferiert und mit einem 2000bp langen, nicktranslatierten HpaII-Fragment hybridisiert, welches das 15S rRNA Gen enthielt (Martin et al., 1982a; zur Isolierung des 2000bp HpaII-Fragmentes siehe Kapitel II).

Von den entsprechenden rho-Stämmen mit positivem Hybridisierungssignal wurde aus je 5g Zellen die mitochondriale DNA gewonnen, über einem Cäsiumchloridgradienten gereinigt und anschließend einem HpaII Restriktionsverdau unterzogen (siehe Material und Methoden).

Die erhaltenen Restriktionsfragmente wurden in einem 1.5%-igen Agarosegel aufgetrennt. Auf Grund der Restriktions- und Hybridisierungsdaten konnte so eine Schar von rho-Genomen mit unterschiedlich langen "repeat units" identifiziert werden, die alle den 15S rRNA Genbereich enthielten (Ergebnisse nicht gezeigt). Als "repeat unit" eines rho-Genomes wird der Teil bezeichnet, der aus dem mitochondrialen rho⁺-Genom exzisiert wird und anschließend - oftmals reiteriert - als ringförmiges Genom in der Zelle vorliegt (siehe Einführung bzw. Material und Methoden).

Der rho-Stamm KLA13 wies dabei, wie aus den Restriktionsdaten ermittelt werden konnte, die kürzeste "repeat unit" mit einer Länge von 10000bp auf. Um zu bestimmen, welcher Bereich des rho⁺-Genomes im betreffenden rho-Stamm zurückbehalten worden war, wurde eine mit-Kartierung durchgeführt (siehe Material und Methoden). Dazu wurde der Stamm mit verschiedenen atlungsdefekten mit-Mutanten gekreuzt. Diese mit-Mutanten trugen jeweils

eine bereits charakterisierte Punktmutation in verschiedenen mitochondrialen Strukturgenen.

Falls das vom rho⁻-Stamm KLA13 zurückbehaltene Genomsegment die Wildtypsequenz zu einer dieser Punktmutationen enthielt (siehe Abb.4), ergeben sich nach Rekombination des rho⁻-Genomes mit der atemungsdefekten mit⁻-Mutante atemungskompetente Nachkommen. Dies kann auf einem nicht vergärbaren Medium (z.B. Glycerin) leicht getestet werden.

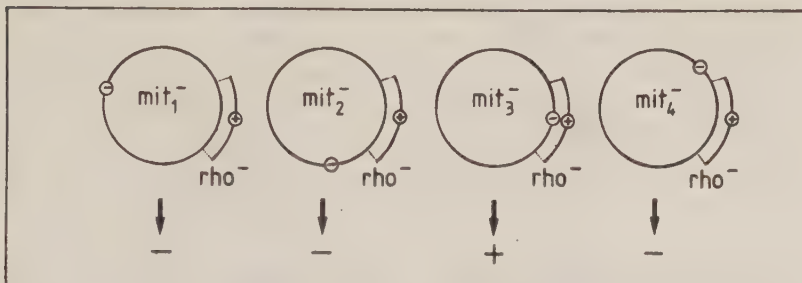


Abb.4 : Rho⁻ x mit⁻ Kreuzung zur genetischen Lokalisierung der KLA13 "repeat unit"

Mit + bzw. - ist Wachstum bzw. kein Wachstum der rekombinanten Nachkommen auf nicht vergärbaren Medien angegeben.

Der Stamm KLA13 ergab nur nach Kreuzung mit einer Punktmutante aus dem *oxi2*-Gen atemungskompetente Nachkommen (Tab.2).

KLA13 x	Mutation des mit ⁻ -Stammes	Wachstum auf Glycerin
777-3A-4901	COB ⁻	-
777-3A-5821	OXI1 ⁻	-
777-3A-5491	OXI2 ⁻	+
777-3A-7374	OXI3 ⁻	-

Tab.2 : Kreuzung des rho⁻-Stammes KLA13 mit mit⁻-Mutanten aus verschiedenen Bereichen des mitochondrialen Genomes

+ bezeichnet Wachstum, - kein Wachstum der rekombinanten Nachkommen auf nicht vergärbaren Medien (vgl. Abb.4).

Dies bedeutet, daß das mitochondriale Genom des rho⁻-Stammes KLA13 das *oxi2*-Gen und - wie schon zuvor mit Hybridisierung nachgewiesen - das Gen für die 15S rRNA enthält.

Abb.5 zeigt die Zusammenfassung der Restriktions- und Hybridisierungsdaten sowie der genetischen Analysen.

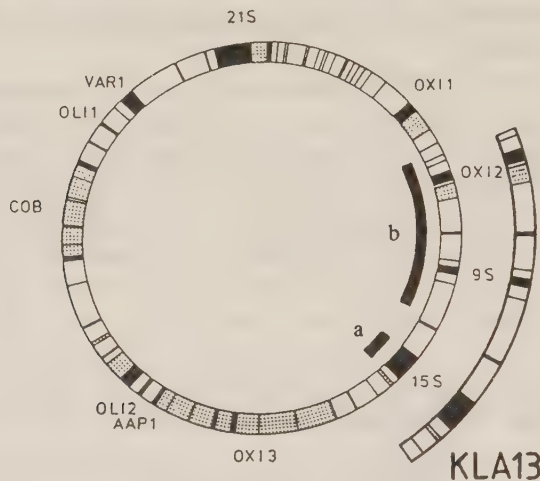


Abb.5 : KLA13 rho⁻-Genom

Der Ring symbolisiert das mitochondriale rho⁺-Genom des Stammes KL14-4A; als Ringsegment ist der vom rho⁻-Stamm KLA13 zurückbehaltene Genomanteil eingezeichnet; a und b stellen nicktranslatierte Hybridisierungsfragmente dar, welche für die weitere Subklonierung des Stammes KLA13 herangezogen wurden; a : 2000bp HpaII-Fragment, welches die 15S rRNA Genregion enthält; b : Genomanteil, der im rho⁻-Stamm KLA4 zurückbehalten wird.

1.2 "Subklonierung" des rho⁻-Stammes KLA13

Das vom rho⁻-Stamm KLA13 zurückbehaltene mitochondriale Genomfragment war mit ca. 10000bp noch zu lang, um die restriktive Mutation einem definierten Bereich des 15S rRNA Genes des Stammes KL14-4A zuordnen zu können (das 15S rRNA Gen besitzt eine Länge von etwa 1650bp, siehe Kapitel II).

Wie bereits erwähnt, sollte die DNA-Sequenz im Bereich des 15S rRNA Genes der Mutante M5631 mit der des Stammes KL14-4A verglichen werden. Da beide Stämme nicht isogen sind, waren auf Grund von Stammpolymorphismen in den mitochondrialen Genomen beider Stämme auf einer Länge von 10000bp viele Basenaustausche zu erwarten. Um die Reduzierung der Rasterschubsuppression möglichst einem einzigen Basenaustausch (oder zumindest einem einzigen Mutationsort) zuordnen zu können, wurde das mitochondriale Genom des rho-Stammes KLA13 "subkloniert", d.h. verkleinert. Das Ziel war es, dadurch den Mutationsort der restriktiven Mutation im 15S rRNA Gen des Stammes KL14-4A einzugrenzen. Die "Subklonierung" konnte - da für Hefemitochondrien kein effizientes Transformationssystem besteht - nicht durch biochemische Verkürzung der KLA13 "repeat unit" mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen durchgeführt werden. Sie erfolgte daher in gleicher Weise wie die Isolierung des rho-Stammes KLA13.

Dazu wurde Zellen dieses Stammes mit Ethidiumbromid der Konzentrationen 40 bis 400 µg/ml behandelt; anschließend sollten rho-Subklone mit "repeat units" kleiner als 10000bp isoliert werden, welche aber noch den 15S rRNA Genbereich enthielten.

1.3 Isolierung und Analyse des rho-Stammes K50

Eine "Subklonierung" des rho-Stammes KLA13 erwies sich als äußerst schwierig. Die Retentionshäufigkeit des 15S rRNA Bereiches war kleiner als 1%; d.h. bei Verkürzung der "repeat unit" des rho-Stammes KLA13 wurde die 15S rRNA Genregion in den allermeisten Fällen exziiert, im rho-Genom zurückbehalten wurden nur Sequenzanteile ohne diesen Genbereich. Dies wurde durch eine "Dot-blot-Analyse" der verschiedenen, durch Ethidiumbromidbehandlung erhaltenen, rho-Subklone des Ausgangsstammes KLA13 überprüft (siehe Material und Methoden). Als Hybridisierungsprobe wurde wiederum das 2000bp lange nicktranslatierte HpaII-Fragment gewählt, das den 15S rRNA Genbereich enthielt (siehe oben). Als negative Kontrolle wurden nicktranslatierte Restriktionsfragmente des rho-Stammes KLA4 verwendet, dessen mitochondriales Genom - aus dem KLA13 Genom abgeleitet - bereits die 15S rRNA

Region exzisiert hatte, und somit nur noch Sequenzanteile zwischen dem *oxi2*-Gen und der 15S rRNA Region enthielt (siehe Abb.5).

Geeignete Subklone des *rho*-Stammes KLA13 konnten somit dadurch isoliert werden, daß die mitochondriale DNA dieser Stämme ein Hybridisierungssignal mit dem nicktranslatierten 2000bp-Fragment des 15S rRNA Genes ergab, jedoch nicht mit nicktranslatierten Restriktionsfragmenten des KLA4-Genomes (vgl. Abb.5).

Von über 10000 *rho*-Stämmen wurde die mitochondriale DNA isoliert, auf Nitrocellulose transferiert und mit den in Abb.5 beschriebenen nicktranslatierten Restriktionsfragmenten hybridisiert (siehe Material und Methoden). Es konnten jedoch keine *rho*-Klone isoliert werden, welche nur den 15S rRNA Bereich zurückbehalten hatten. Um auszuschließen, daß das mitochondriale Genom des Stammes KLA13 ungeeignet für eine weitere genetische Subklonierung wäre, wurden parallel dazu ca. 5000 *rho*-Klone aus dem *rho*⁺-Stamm KL14-4A isoliert und wie oben beschrieben analysiert. Doch auch hier fanden sich keine *rho*-Klone, die nur das 15S RNA Gen enthielten.

Da in den jeweils isolierten und analysierten *rho*-Genomen der 15S rRNA Bereich zwar exzisiert, nicht aber zu einem *rho*-Genom reiteriert und repliziert wurde, lag die Vermutung nahe, daß in *rho*-Genomen, die nur das 15S rRNA Gen enthielten, ein Replikationsorigin völlig fehlte oder Sequenzbereiche vorhanden waren, welche nur unzureichend als solcher fungieren konnten. Die Folge davon wäre, daß bei Segregation der *rho*-Klone nach Ethidiumbromidmutagenese jene *rho*-Klone langsamer replizierten, welche nur die 15S rRNA Region enthielten; das würde bedeuten, daß solche Stämme in einer *rho*-Population außerordentlich unterrepräsentiert wären (Segregation : nach Ethidiumbromidmutagenese wurde die *rho*-Population über Nacht in Glukosemedium gezüchtet, damit sich in den einzelnen Stämmen homoplasmische Mitochondrienpopulationen ausbilden konnten. Als homoplasmisch werden dabei jene Stämme bezeichnet, die Mitochondrien mit einheitlichen mitochondrialen Genomen enthalten).

Um den selektiven Nachteil von *rho*-Klonen mit fehlenden oder unzureichenden Replikationsorigins zu kompensieren, wurden in einem neuen Ansatz die Klone nach Ethidiumbromidbehandlung sofort, d.h. ohne vorherige Segregation, über Nacht auf Glukoseme-

dium zu Einzelkolonien ausplattiert. Unter diesen Versuchsbedingungen wurden weitere 5000 Subklone des Stammes KLA13 untersucht. Hierbei wurde ein einziger Klon - der rho⁻-Stamm K50 - mit einem positiven Hybridisierungssignal identifiziert; d.h. seine mitochondriale DNA ergab ein Hybridisierungssignal mit einem 2000bp langen nicktranslatierten HpaII-Fragment des 15S rRNA Genbereichs; kein Hybridisierungssignal wurde mit mitochondrialen nicktranslatierten DNA-Fragmenten des rho⁻-Stammes KLA4 erhalten (vgl. Abb.5 und siehe Abb.6).

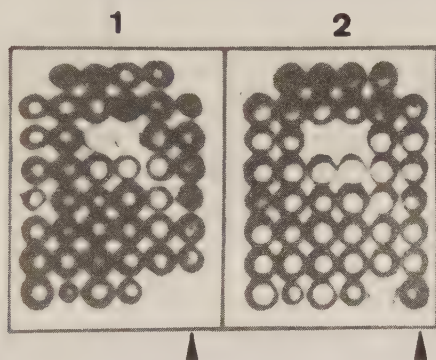


Abb.6 : Dotblot-Hybridisierung von Subklonen des rho⁻-Stammes KLA13

1) Hybridisierung der auf Nitrocellulose transferierten, mitochondrialen DNA von KLA13-Subklonen mit einem nicktranslatierten Restriktionsfragment des rho⁻-Stammes KLA4 (vgl. Abb.5, Fragment b). 2) Hybridisierung der gleichen Subklon-DNA mit einem 2000bp langen nicktranslatierten HpaII-Fragment, welches die 15S rRNA Genregion enthält (vgl. Abb.5, Fragment a); der rho⁻-Klon K50 ist durch einen Pfeil markiert.

Vom Klon K50 wurde die mitochondriale DNA in größeren Mengen (aus 5g Zellen) isoliert, über einem Cäsiumchloridgradienten gereinigt und mehrere Restriktionsanalysen (mit BamHI, HpaII bzw. Sau3A) durchgeführt. Die erhaltenen Restriktionsfragmente wurden in einem 1.5%-igen Agarosegel aufgetrennt (siehe Material und Methoden, Ergebnisse nicht gezeigt). Auf Grund dieser Daten ließ sich der vom rho⁻-Klon K50 zurückbehaltene Genomanteil mit einer

Länge von ca. 4000bp wie in Abb.7 gezeigt auf dem mitochondrialen rho⁺-Genom lokalisieren.

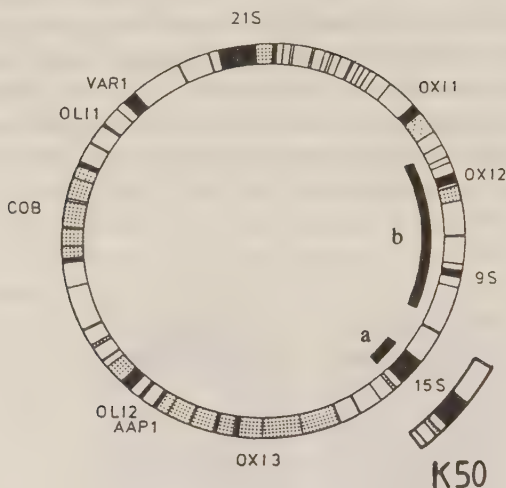


Abb.7 : K50 rho⁻-Genom

Der Ring symbolisiert das mitochondriale rho⁺-Genom des Stammes KL14-4A. Als Ringsegment ist der vom rho⁻-Stamm K50 zurückbehaltene Genomanteil eingezeichnet; a und b stellen die für die Isolierung dieses Klonen verwendeten, nicktranslatierten Hybridisierungsfragmente dar (vgl. Abb.5).

1.4 "Subklonierung" des rho⁻-Stammes K50

Das vom rho⁻-Klon K50 zurückbehaltene Genomsegment wies zwar nur eine Länge von ca. 4000bp auf (d.h. es waren rund 95% der übrigen mitochondrialen Sequenzen in diesem Genom deletiert); es war aber noch zu lang, um die darauf enthaltene restriktive Mutation einem bestimmten Bereich des 15S rRNA Genes zuordnen zu können. Deshalb wurde eine dritte "Subklonierung" durchgeführt. Zellen des rho⁻-Stammes K50 wurden mit Ethidiumbromidkonzentrationen von 40 bis 400 µg/ml, wie in Material und Methoden beschrieben, mutagenisiert.

5000 Subklone wurden isoliert und analysiert (siehe Material und Methoden). Die mitochondriale DNA der einzelnen Subklone wurde

Unterer Teil : Durchgezogene Linien zeigen die mitochondrialen Genomseg-

Stammes K50 im 15S rRNA Genbereich lokalisiert werden. Diese wurden als 1A, KV8, KV13, KV14, KV15, KVV1, KVV3 und KVV7 bezeichnet (siehe Abb.8). Mit diesen acht Subklonen wurden die folgenden genetischen Analysen durchgeführt.

2. Genetische Kartierung der restriktiven Mutation im 15S rRNA Gen des Stammes KL14-4A

Es sollte nun untersucht werden, welche aus dem Stamm KL14-4A erhaltenen rho-Klone des 15S rRNA Genbereiches die restriktive Mutation trugen. Wie in der Einleitung bereits erwähnt, bewirkt diese Mutation, nach Integration in das 15S rRNA Gen der Raster Schubmutante M5631, eine Reduzierung der Rasterschubsuppression im oxil-Gen. Da dadurch weniger funktionelles oxil-Genprodukt gebildet wird als in der Originalmutante M5631, ist folglich das leaky Wachstum dieser (Doppel-)mutante erheblich erniedrigt. Die in Abb.8 aufgeführten rho-Klone wurden daher jeweils mit der leaky wachsenden Mutante M5631, wie in Material und Methoden beschrieben, gekreuzt. Wenn das vom entsprechenden rho-Klon zurückbehaltene Genomsegment die restriktive Mutation enthält und in das rho⁺-Genom der Mutante M5631 durch Rekombination integriert wird, sollte dies zu Kolonien führen, die eine Reduzierung des leaky Wachstums der Originalmutante aufweisen (siehe Abb.9).

Tatsächlich ergaben Kreuzungen der Mutante M5631 mit den rho-Stämmen KV13, KV14, KV15 bzw. KVV1 etwa 3-19% Kolonien die ein abgeschwächtes leaky Wachstum zeigten. Dies zeichnete sich dadurch aus, daß solche Kolonien weder bei 23°C noch bei 30°C wachsen konnten und bei 36°C erheblich schwächer als die Originalmutante M5631 wuchsen. Dies wird im weiteren als "reduziertes leaky Wachstum" bezeichnet (zu den Phänotypen siehe Abb.9 und zu den Kreuzungen Tabelle 3).

In den Kreuzungen der Mutante mit den rho-Subklonen KV8, KVV3, KVV7 oder 1A wurden nur Kolonien mit elterlichen Phänotypen beobachtet, d.h. atmungsdefekte Kolonien (rho⁻) und leaky wachsende Kolonien (M5631, siehe Tabelle 3). Durch Integration der mitochondrialen Genomfragmente dieser rho-Stämme in das Ge-

Kreuzungen	rho-		leaky		reduziert leaky		Anzahl an getesteten Kolonien
	23°, 30°, 36°C	- - -	23°, 30°, 36°C	- ++ ++	23°, 30°, 36°C	- - +	
M5631 x KL14-4A [rho ^o]	0.0%		100.0% (PS)		0.0%		500
M5631 x *KVI5	22.5%		72.0% (PS)		5.5% (PR)		450
M5631 x *KVV1	28.0%		69.0% (PS)		3.0% (PR)		192
M5631 x *KVI3	18.0%		65.0% (PS)		17.0% (PR)		480
M5631 x *KVI4	28.5%		52.0% (PS)		19.0% (PR)		440
M5631 x KVV3	28.0%		72.0%		0.0%		350
M5631 x KVV7	80.0%		20.0%		0.0%		480
M5631 x KV8	19.0%		81.0%		0.0%		400
M5631 x 1A	20.0%		80.0%		0.0%		500

Tab.3 : rho^o-Deletionskartierung zur Lokalisierung der restriktiven Mutation

Die Kreuzungen wurden durchgeführt, wie in Material und Methoden beschrieben. Nach 8 Tagen konnten drei verschiedene Kolonietypen unterschieden werden : rho^o-Kolonien, welche nicht in der Lage sind auf einem nicht vergärbaren Medium zu wachsen, leaky wachsende Kolonien und Kolonien mit reduziertem leaky Phänotyp. Das Wachstum der entsprechenden Kolonien bei drei Temperaturen ist mit + bzw. + + angegeben, verglichen mit Wildtypwachstum, das mit + + + + bezeichnet wird; kein Wachstum ist mit - angeführt. Atmungsdefekte Zellen (rho⁻) können auf Glycerinmedium nicht wachsen.

PR = par^r-454 (eine Mutation im Gen der 15S rRNA); der "potenziell Paromomycin-resistente" Phänotyp in reduziert leaky wachsenden Zellen ist mit PR bezeichnet, da alle Zellen einer solchen Kolonie die par^r-454 Mutation tragen; Zellen mit leaky Phänotyp sind Paromomycin-sensitiv.

nom der Mutante M5631 konnte also keine Reduzierung der spontanen Rasterschubsuppression erreicht werden.

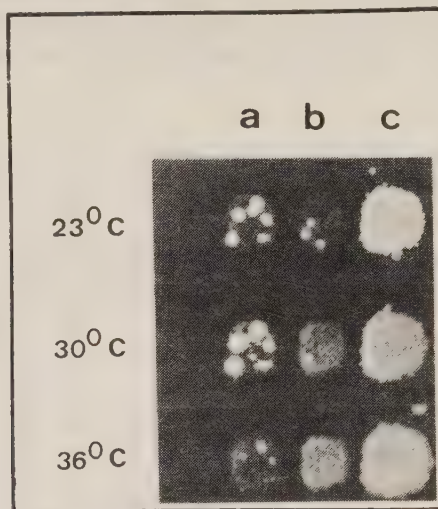


Abb.9 : Phänotyp einer reduziert leaky (a) und einer leaky wachsenden Kolonie (b) aus der Kreuzung KV13 x M5631 auf einem nicht vergärbaren Medium bei drei Temperaturen; im Vergleich dazu das Wachstum des entsprechenden Wildtypstammes (c)

Die jeweiligen Kolonien wurden in einer Mikrotiterplatte in YD-Medium hochgezogen, anschließend auf drei YG-Platten gestempelt und bei 23°, 30° und 36°C für 8 Tage inkubiert. Die Pusteln innerhalb der Kolonien der Spur a und b stellen Revertanten der Rasterschubmutation M5631 dar (M5631→WT).

In einer Kontrollkreuzung der Rasterschubmutante M5631 mit dem rho⁰-Stamm des KL14-4A, der kein mitochondriales Genom besitzt, zeigten alle Kolonien den elterlichen leaky Phänotyp (Tab.3).

Diese Ergebnisse implizieren, daß die restriktive Mutation des Stammes KL14-4A innerhalb der Genom-Segmente lokalisiert ist, welche in den rho⁰-Klonen KV13, KV14, KV15 und KVV1 zurückbehalten werden (vgl. dazu Abb.8). Wie in Abb.8 gezeigt, haben diese Klone 365bp des 3'-Endes des 15S rRNA Genes als gemeinsamen Sequenzanteil zurückbehalten. Dies bedeutet, daß die restriktive Mutation im Stamm KL14-4A innerhalb dieses Bereiches kartiert.

3. Molekulare Analyse der restriktiven Mutation

3.1 Sequenzierung des 365bp-Bereiches im rho⁻-Stamm KV13

Um den 365bp langen Bereich zu sequenzieren, wurde die mitochondriale DNA aus dem Stamm KV13 isoliert und mit HpaII geschnitten (Abb.10).

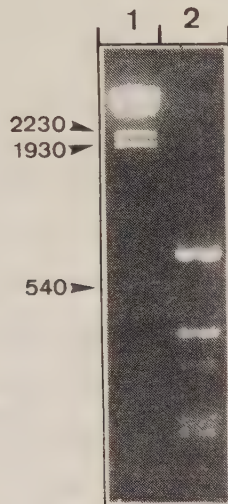


Abb.10 : KV13 HpaII-Restriktion

Die Auftrennung der Restriktionsfragmente erfolgte in einem 1.5%-igen Agarosegel. 1) Längenmarker : λ -DNA geschnitten mit HindIII. 2) Mitochondriale DNA des rho⁻-Stammes KV13, die mit dem Restriktionsenzym HpaII verdaut wurde.

Nach Auftrennung der Restriktionsfragmente in einem 1.5%-igen Agarosegel und anschließender Elution der DNA-Fragmente aus dem Gel wurden diese jeweils in einen mit AccI geschnittenen M13 Vektor (mp8) einkloniert (siehe Material und Methoden). Die Se-

quenzierung erfolgte nach der Kettenabbruchmethode von Sanger (1977), wie in Material und Methoden beschrieben.

Dabei erwies sich die DNA-Sequenz identisch mit der des rho⁺-Stammes KL14-4A, aus dem dieser rho⁻-Stamm erhalten wurde (vgl. dazu Kapitel II). Dies schließt aus, daß während der verschiedenen Mutagenesen der rho⁻-Isolation und Subklonierung zusätzliche Mutationen innerhalb des 15S rRNA Bereiches induziert worden waren.

3.2 Identifizierung der restriktiven Mutation

Die DNA-Sequenz des 365bp langen Bereiches im 15S rRNA Gen der Rasterschubmutante M5631 wurde in analoger Weise ermittelt (zur vollständigen Sequenzierung der 15S rRNA Gene der Stämme KL14-4A und M5631 siehe Kapitel II).

1281	ATAATAAAATTATATAAAATATATTTAATTATATTTAATTAATAATATAAAACATTTTAAATTTTAAATATATTTTTTTAT
1361	TATATATTAAATGAATTATAATCTGAAATTCGATTATATGAAAAAGAATTGCTAGTAATACGTAAATTAGTATGTTAC
1441	GGTGAATATTCTAACTGTTTCGCACTAATCACTCATC ^G _C CGTTGAAACATATTATTATCTTATTATTATATAATATT
1521	TTTAATAAAATTAATAAATTATTAATTATTTATTTATATCAGAAATAATATGAATTAATGCGAAGTTGAAATACAGT
1601	TACCGTAGGGGAACCTGCGGTGGGCTATAAATATCTTAAATATTCTTACA

Abb.11 : Der Basenaustausch C nach G der restriktiven Mutation

DNA-Sequenz des 365bp Bereiches am 3'-Ende der 15S rRNA im Stamm M5631; der Basenaustausch C nach G an Pos.1479 im Stamm KL14-4A ist durch einen Stern angezeigt.

Die DNA-Sequenz der Rasterschubmutante M5631 unterscheidet sich in diesem Bereich nur durch einen einzigen Basenaustausch an Position 1479 von der Sequenz des Stammes KL14-4A (Nummerierung im Wildtypstamm 777-3A, Hüttenhofer et al., 1988). An Position 1479 trägt die Rasterschubmutante M5631 und auch der parentale Wildtypstamm 777-3A ein Cytosin (C), während der Stamm KL14-4A ein Guanin (G) an dieser Stelle besitzt (Abb.11). Damit

stellt dieser Basenaustausch C→G die restriktive Mutation im Stamm KL14-4A dar (es sei hier noch einmal darauf hingewiesen, daß die Rasterschubmutante M5631 außer ihrer Rasterschubmutation im oxil-Gen keine Zweitmutation trägt : Weiss-Brummer et al., 1987; dies bedeutet, daß sie die Wildtypsequenz des 15S rRNA Genes enthält).

Li et al. (1982) hatten bereits früher nachgewiesen, daß der Basenaustausch von C nach G an Pos.1479 innerhalb der 15S rRNA des Stammes D273-10B dem betreffenden Stamm Resistenz gegen das Antibiotikum Paromomycin verleiht : ein C an dieser Position bedeutet daher, daß der entsprechende Stamm Paromomycin-sensitiv, ein G an Position 1479, daß der Stamm Paromomycin-resistent ist. In sensitiven Stämmen steigert das Aminoglykosidantibiotikum Paromomycin die Fehlerrate des mitochondrialen Translationsapparates. Folglich sind solche Stämme nicht in der Lage, auf Paromomycin-haltigen Medien zu wachsen.

Der Basenaustausch von C nach G wurde von Li et al (1982) als "par^r-454 Mutation" bezeichnet. Die Ergebnisse von Li et al. werden durch die in dieser Arbeit sequenzierten Stämme M5631 und KL14-4A bestätigt. Der Stamm M5631, der ein C an Pos.1479 trägt, erwies sich auf Selektivplatten als Paromomycin-sensitiv, während der Stamm KL14-4A, der ein G an dieser Stelle enthält, Paromomycin-resistent ist (Tabak et al. 1982).

Li et al. (1982) zeigten außerdem, daß durch den Basenaustausch C nach G - die par^r-454 Mutation - eine Erkennungsstelle für das Restriktionsenzym *Tha*I zerstört wird (CGCG = *Tha*I → GGCG). So können Stämme, welche die par^r-454 Mutation tragen, leicht durch die Abwesenheit der *Tha*I-Restriktionsstelle an dieser Position identifiziert werden.

Es sollte nun überprüft werden, ob das reduzierte leaky Wachstum von Kolonien aus der Kreuzung KV13 x M5631 tatsächlich durch die Integration der par^r-454 Mutation in das mitochondriale Genom der Mutante M5631 hervorgerufen wird. Dazu wurden aus dieser Kreuzung 20 Kolonien mit reduziertem leaky Phänotyp und 20 Kolonien mit leaky Phänotyp auf die An- bzw. Abwesenheit dieser *Tha*I-Stelle untersucht.

4. Die *ThaI*-Restriktionsstelle an Pos.1479 in Zellen mit leaky und reduziertem leaky Phänotyp

Aus der Kreuzung M5631 x KV13 wurde von 20 Kolonien mit leaky Phänotyp und 20 Kolonien mit reduziertem leaky Phänotyp (vgl. Abb.9) die mitochondriale DNA isoliert und mit dem Restriktionsenzym *ThaI* geschnitten. Nach Auftrennung der Restriktionsfragmente in einem 1.5%-igen Agarosegel wurden diese auf Nitrocellulosepapier transferiert (siehe Material und Methoden). Die Hybridisierung erfolgte mit einem nicktranslatierten BamHI-Sau3A Fragment (540bp Länge) wie in Abb.8 beschrieben. Falls die *ThaI*-Stelle an Position 1479 im betreffenden Stamm vorhanden ist, ergibt sich als Hybridisierungssignal ein 750bp langes *ThaI*-*ThaI* Fragment, falls die *ThaI*-Stelle fehlt, ein Fragment von ca. 1200bp Länge (Abb.8).

Wie erwartet, trat bei allen 20 getesteten leaky wachsenden Kolonien ein 750bp langes Hybridisierungsfragment auf, wohingegen bei allen 20 Kolonien mit reduziertem leaky Wachstum ein 1200bp langes Hybridisierungsfragment auftauchte (Ergebnisse nicht gezeigt). Das bedeutet, daß alle leaky wachsenden Zellen die *ThaI*-Stelle tragen; sie fehlt jedoch bei allen reduziert leaky wachsenden Kolonien, diese Zellen enthalten also alle die *par^r-454* Mutation. Die Folgerung daraus ist, daß die *par^r-454* Mutation in Zellen mit reduziertem leaky Wachstum durch Rekombination des KV13 *rho*-Genomabschnittes in das mitochondriale Genom der Rasterschubmutante M5631 integriert wurde. Dies bewirkt, daß diese rekombinanten Zellen auf Grund reduzierter Rasterschubsuppression auf nicht vergärbaren Medien nur noch reduziert leaky wachsen können. Auf Grund der Daten läßt sich die Reduzierung der Rasterschubsuppression unmittelbar mit dem Vorhandensein der *par^r-454* Mutation innerhalb des 15S rRNA Genes korrelieren.

5. Analyse der mitochondrialen Translationsprodukte von Zellen mit leaky, reduziertem leaky und Wildtypwachstum

Um zu untersuchen, ob der Phänotyp von Zellen mit reduziertem leaky Wachstum tatsächlich daraus resultiert, daß in diesen Zellen spezifisch die Rasterschubsuppression reduziert ist, und die Reduzierung des leaky Wachstums nicht etwa von einer allgemeinen Reduzierung der Translationseffizienz herrührt, wurden die mitochondrialen Translationsprodukte eines reduziert leaky wachsenden Stammes aus der Kreuzung KV13 x M5631 analysiert.

Parallel dazu wurden die mitochondrialen Proteine des zugehörigen Wildtypstammes 777-3A und der Originalmutante M5631 ohne restriktive $\text{par}^{\text{r-454}}$ Mutation untersucht (siehe Material und Methoden).

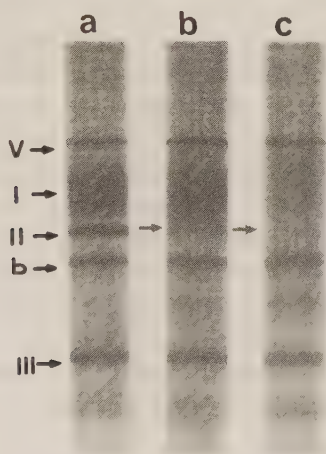


Abb.12 : Mitochondriale Translationsprodukte

Spur a : Wildtypstamm 777-3A; Spur b : die leaky wachsende Mutante M5631; Spur c : eine reduziert leaky wachsende Kolonie, entstanden durch die Integration der $\text{par}^{\text{r-454}}$ Mutation in das mitochondriale Genom der Mutante M5631 aus der Kreuzung KV13 x M5631.

Pfeile an der linken Seite; V : varI -Protein; I, II und III : Untereinheit I, II und III der Cytochrom-c-Oxidase; durch einen Pfeil ist die Untereinheit II markiert, deren Gen die Rasterschubmutation in den Stämmen b und c trägt.

Wie in Abb.12 gezeigt, beträgt die Menge an Untereinheit II der Cytochrom-c-Oxidase der Mutante M5631 etwa 20% dessen, was der entsprechende Wildtypstamm 777-3A produziert (zur Mengenbestimmung siehe Material und Methoden). Das Gen für dieses Protein - das *oxil*-Gen - ist, wie bereits mehrfach erwähnt, in der Mutante M5631 durch Baseninsertion mutiert.

In Zellen mit reduziertem leaky Phänotyp, welche die *par^r-454* Mutation tragen, wird nur 10% der Wildtypmenge an Untereinheit II der Cytochrom-c-Oxidase gebildet, alle anderen Translationsprodukte sind in Wildtypmengen vorhanden. Dabei wurde die Untereinheit I der Cytochrom-c-Oxidase nicht in die Betrachtung miteinbezogen, da frühere Befunde (Weiss-Brummer 1979, sowie nicht publizierte Ergebnisse) darlegten, daß in Mutanten, denen Untereinheit II fehlt oder in denen diese reduziert ist, auch die Untereinheit I der Cytochrom-c-Oxidase entsprechend vermindert gebildet wird. Da beide Proteine als Untereinheiten in einem funktionalen Proteinkomplex auftreten, ist die simultane Abnahme der Untereinheit I der Cytochrom-c-Oxidase wohl eher einem regulatorischen Assembly-Effekt zuzuschreiben. Die Tatsache, daß in Stämmen mit reduziertem leaky Phänotyp nur die Hälfte (10% der Wildtypmenge) an Untereinheit II der Cytochrom-c-Oxidase gebildet wird wie in der leaky wachsenden Originalmutante M5631 (20%), ist in Übereinstimmung mit dem beobachteten Wachstum auf nicht vergärbaren Substraten : reduziert leaky ↔ leaky.

Aus dem Befund, daß die *par^r-454* Mutation in Zellen mit reduziertem leaky Wachstum nur die Synthese der Untereinheit II hemmt, kann geschlossen werden, daß diese Mutation auch demzufolge spezifisch die spontane Rasterschubsuppression reduziert, da die spontane Rasterschubsuppression die Voraussetzung für die Bildung dieses Proteines darstellt.

6. Die *par^r-454* Mutation und Resistenz gegen das Antibiotikum Paromomycin

Da Kolonien mit reduziertem leaky Phänotyp die *par^r-454* Mutation tragen, sollten sie nach Li et al. (1982) auch einen Paromomycin-resistenten Phänotyp auf paromomycinhaltigen Selektionsplatten auf-

weisen. Der Phänotyp des die par^r-454 Mutation tragenden Paromomycin-resistenten Stammes KL14-4A ist in Abb.13A gezeigt.

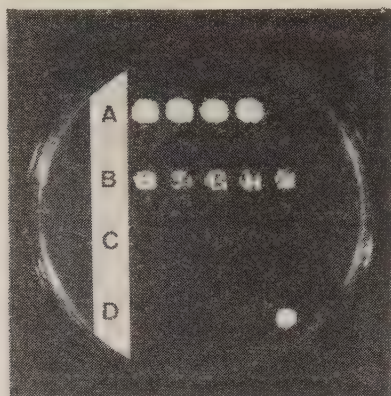


Abb.13 : Phänotyp von Paromomycin-resistenten, "potentiell Paromomycin-resistenten" und Paromomycin-sensitiven Zellen auf Selektivplatten

Die jeweiligen Kolonien wurden in einer Mikrotiterplatte, welche YG-Medium enthielt, bis zur stationären Phase hochgezogen und anschließend auf eine Selektivplatte gestempelt, die Paromomycin enthielt (siehe Material und Methoden); die Platte wurde für 6 Tage bei 30°C inkubiert.

A) Zellen des Paromomycin-resistenten Stammes KL14-4A; B) "Potentiell Paromomycin-resistente" Zellen aus der Kreuzung KV13 x M5631; C) Zellen des Paromomycin-sensitiven Stammes M5631 (da dieser Stamm die rezessive $pet9$ ($op1$) Kernmutation trägt, welche auf nicht vergärbaren Medien zur Atmungsdefizienz des betreffenden Stammes führt, mußten diese Zellen mit dem ρ^0 -Abkömmling des Stammes KL14-4A gekreuzt werden, der das $OP1$ Wildtypallel besitzt); D) Eine Paromomycin-resistente Kolonie wurde aus der Kreuzung KL14-4A [ρ^+] x 777-3A [ρ^+] isoliert.

Unter Zellen mit reduziertem leaky Phänotyp, welche die par^r-454 Mutation besitzen, konnte jedoch keine vollständig Paromomycin-resistente Kolonie gefunden werden. Diese Zellen waren nicht in der Lage, auf paromomycinhaltigen Selektionsplatten zu wachsen, jedoch traten nach einigen Tagen Bebrütung innerhalb einer solchen Kolonie resistente Zellen mit einer Häufigkeit von 10^{-4} auf (Abb.13B). Der Phänotyp einer solchen heterogenen Kolonie wurde als "potentiell Paromomycin-resistent" bezeichnet. Die Reversionsrate zu Paromomycin-resistenten Zellen wurde folgender-

maßen bestimmt : etwa 10^8 Zellen wurden auf einer Paromomycin-haltigen Selektionsplatte ausplattiert. Unter diesen Zellen traten etwa 10^4 Paromomycin-resistente Kolonien auf.

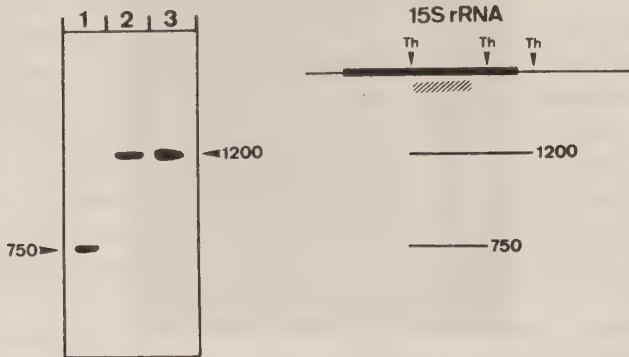


Abb.14 : Southern-Analyse von nichtresistenten und vollresistenten Zellen einer "potentiell Paromomycin-resistenten" Kolonie

Von den entsprechenden Zellen einer "potentiell Paromomycin-resistenten" Kolonie wurde die mitochondriale DNA isoliert, mit *Thal* geschnitten, in einem 1.5%-igen Agarosegel aufgetrennt und mit einem nicktranslatierten BamHI-Sau3A-Fragment (schraffiert dargestellt) hybridisiert. Falls die 15S rRNA des entsprechenden Stammes die *par^r-454* Mutation trägt, wird die *Thal*-Stelle am 3'-Ende des 15S rRNA Genes zerstört und ein ca. 1200bp langes *Thal*-*Thal* Hybridisierungsfragment tritt auf; falls die *par^r-454* Mutation nicht vorhanden ist, entsteht ein 750bp langes *Thal*-*Thal* Hybridisierungsfragment.

Spur 1 : Kontrolle einer Paromomycin-sensitiven Kolonie, welcher die *par^r-454* Mutation fehlt; Spur 2 : vollresistente Zellen einer "potentiell Paromomycin-resistenten" Kolonie; Spur 3 : nicht-resistente Zellen einer "potentiell Paromomycin-resistenten" Kolonie; sowohl in Spur 2 als auch in Spur 3 tritt ein 1200bp langes *Thal*-*Thal* Fragment auf; dies bedeutet, daß sowohl die nicht-resistenten als auch die vollresistenten Zellen einer "potentiell Paromomycin-resistenten" Kolonie die *par^r-454* Mutation enthalten.

Eine solche Population vollresistenter und nichtresistenter Zellen wurde auf die Anwesenheit der *par^r-454* Mutation überprüft. Da durch diese Mutation eine *Thal*-Restriktionsstelle zerstört wird, können Zellen, welche die *par^r-454* Mutation tragen, leicht an der Abwesenheit dieser Restriktionsstelle erkannt werden. Dies wurde,

wie unter 4. bereits beschrieben, in einer Southernanalyse untersucht (siehe Abb.14).

Dabei zeigte sich, daß alle Zellen, d.h. sowohl die resistenten als auch die nicht resistenten Zellen einer "potentiell Paromomycin-resistenten" Kolonie die $\text{par}^r\text{-454}$ Mutation trugen. Das bedeutet, daß diese Mutation, in den Stamm M5631 eingekreuzt, allein nicht ausreicht, um Paromomycinresistenz zu induzieren. Kolonien der Originalmutante M5631, welchen die $\text{par}^r\text{-454}$ Mutation fehlt, revertieren spontan mit einer viel geringeren Häufigkeit (10^{-7}) zur Paromomycinresistenz als Zellen, die diese Mutation tragen (10^{-4}); d.h. die $\text{par}^r\text{-454}$ Mutation ist zwar an der Ausbildung der Paromomycinresistenz beteiligt, aber im Stamm M5631 allein nicht ausreichend, um Paromomycinresistenz zu induzieren.

In einer Kontrollkreuzung des Stammes KL14-4A rho^+ mit dem parental Wildtypstamm der Mutante M5631, dem Stamm 777-3A rho^+ , traten nur vollresistente bzw. nichtresistente Phänotypen auf. Dies schließt aus, daß der Stamm 777-3A und die daraus abgeleitete Mutante M5631 einen dominanten Kernsuppressor gegen die Paromomycinresistenz tragen.

Alle diese Daten zeigen, daß die $\text{par}^r\text{-454}$ Mutation - in das mitochondriale Genom der Mutante M5631 integriert - ausreichend ist, um in diesem Stamm eine Reduzierung der spontanen Rasterschub-suppression zu bewirken. Die Mutation allein genügt aber nicht, um im Stamm M5631 und dem parental Wildtypstamm 777-3A Paromomycinresistenz zu induzieren.

Diskussion

Reduzierung der spontanen mitochondrialen Rasterschub-suppression der Mutante M5631 durch die par^r-454 Mutation

In diesem Teil der Arbeit konnte gezeigt werden, daß ein Faktor des mitochondrialen Translationsapparates existiert, der den Grad der Translationsgenauigkeit in Mitochondrien beeinflußt. So verursacht der Basenaustausch C→G an Pos.1479 (die restriktive par^r-454 Mutation) innerhalb des mitochondrialen 15S rRNA Genes eine Erniedrigung der spontanen Rasterschubsuppression der Rasterschubmutante M5631.

Da diese Erniedrigung der Rasterschubsuppression (d.h. des spontanen Leserahmenwechsels) durch die G-Base an Pos.1479 auf eine vermehrte Translationsgenauigkeit (bezüglich der Einhaltung des Leserahmens) zurückzuführen sein sollte, weist dies darauf hin, daß die G-Base an Pos.1479 der mitochondrialen 15S rRNA in der Lage ist, die Translationsgenauigkeit in Mitochondrien zu erhöhen. Andererseits bedeutet dies, daß die ursprüngliche C-Base an Pos.1479 in der mitochondrialen Wildtyp 15S rRNA der Mutante M5631 die natürliche Rasterschubsuppression dieses Stammes ermöglicht und somit zur Erniedrigung der mitochondrialen Translationsgenauigkeit beiträgt.

Damit wurde zum ersten Male in vivo eine bestimmte Stelle innerhalb einer ribosomalen RNA identifiziert, welche die Einhaltung der Translationsgenauigkeit unmittelbar beeinflußt. Dies spricht gleichzeitig dafür, daß der 15S rRNA nicht nur - wie bis vor kurzem angenommen - eine strukturelle Bedeutung innerhalb des mitochondrialen Ribosomes zukommt, sondern daß dieses Molekül unmittelbar an wichtigen Funktionen des Translationsprozesses beteiligt ist.

Um etwas über den Mechanismus zu erfahren, auf welche Weise die Base C1479 die mitochondriale Translationsgenauigkeit erniedrigt, während diese durch die Base G1479 erhöht wird, muß auf Struktur-Funktions-Untersuchungen der 16S rRNA von *E. coli* zurückgegriffen werden.

Dieses Molekül ist im Gegensatz zur mitochondrialen 15S rRNA bereits extensiv von verschiedenen Arbeitsgruppen hinsichtlich seiner Primär-, Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur untersucht worden (Review : Noller, 1984). Dabei ist wichtig, daß die mitochondriale 15S rRNA und die 16S rRNA von *E. coli* ausgesprochen große Homologien aufweisen, was ihre Primärstruktur (Sor und Fukuhara, 1982a; Li et al., 1982) und auch ihre Sekundärstruktur (>80%) betrifft (Moazed et al., 1986; Hüttenhofer et al., 1988, siehe auch Kapitel II). Dies läßt darauf schließen, daß funktionale Bereiche der 16S rRNA von *E. coli* auf das mitochondriale 15S rRNA Molekül übertragen werden können.

Wie in Abb.15 gezeigt, kann das 3'-Ende der mitochondrialen 15S rRNA in eine Stamm-Schleifen Struktur gefaltet werden (Li et al., 1982; Hüttenhofer et al., 1988), die in Pro- und Eukaryonten hochkonserviert ist (Huysmans und De Wachter, 1986). Die Stelle der par^r-454 Mutation liegt in diesem Bereich (Pos.1479 nach der Nummerierung von Hüttenhofer et al., 1988).

Die Wildtyp 15S rRNA der Rasterschubmutante M5631 enthält an Pos.1479 ein C-Base, welche mit einer G-Base an Pos.1585 eine Watson-Crick Basenpaarung eingehen kann (siehe Abb.15). In Zellen, welche auf Grund der par^r-454 Mutation (Basenaustausch C nach G an Pos.1479) eine erhöhte Translationsgenauigkeit aufweisen, wird diese Basenpaarung verhindert.

Dem Mutationsort an Pos.1479 der mitochondrialen 15S rRNA entspricht innerhalb der 16S rRNA von *E. coli* die Pos.1409 (Abb.16). Dieser Bereich am 3'-Ende der 16S rRNA wird als sogenannte "C-1400 Region" bezeichnet. Mehrere Befunde sprechen dafür, daß die C-1400 Region als Dekodierungszentrum des Ribosomes fungiert. Zum einen ist die C-Base an Pos.1400 (daher C-1400 Region) in Hefe, Prokaryoten und *Artemia salina* konserviert. Zum anderen kann diese Base mit dem Anticodon der tRNA^{Val} von *E. coli* durch sogenanntes "crosslinking" verknüpft werden, wenn sich diese tRNA an der Peptidyl-Stelle des Ribosomes befindet (Ofengand et al., 1986).

Moazed und Noller (1986, 1987) wiesen nach, daß Basen der C-1400 Region durch die Bindung von tRNAs oder Aminoglykosidantibiotika vor chemischen Modifikationen geschützt sind. Umgekehrt bewirkt die Modifizierung von Basen der C-1400 Region

Resistenz gegen Aminoglykosidantibiotika (Beaucklerk und Cundliffe, 1987). Da Aminoglykosidantibiotika dafür bekannt sind, eine fehlerhafte Dekodierung zu verursachen, sollten ihre Wirkorte Bereiche innerhalb des Ribosomes sein, an denen die Genauigkeit der Codon-Anticodon Wechselwirkung festgelegt wird (Beaucklerk und Cundliffe, 1987).

Oakes et al. (1986) zeigten zudem, daß die C-1400 Region von *E. coli* an der Oberfläche der kleinen ribosomalen Untereinheit des *E. coli* Ribosomes lokalisiert ist und somit für tRNA/mRNA Interaktionen zugänglich ist.

Alle diese Befunde deuten darauf hin, daß die C-1400 Region als Dekodierungszentrum des Ribosomes fungiert. Dabei ist die restriktive $\text{par}^r\text{-454}$ Mutation, welche die mitochondriale Translationsgenauigkeit erhöht, nur neun Basen von der C-1400 homologen Base der mitochondrialen 15S rRNA entfernt (Abb.15).

Kürzlich wurden von Hui et al. (1988) spezifische Mutationen innerhalb der C-1400 Region des 16S rRNA Genes von *E. coli* induziert. Sowohl die C-1400 Base selbst als auch die Basen der angrenzenden Stammstruktur wurden dabei durch eine "site-directed" Mutagenese verändert. Anschließend bestimmten die Autoren in einem speziellen Ribosomensystem, auf das hier nicht näher eingegangen werden soll, die ribosomale Aktivität (d.h. die Translationsrate) von Ribosomen mit mutierter 16S rRNA.

Dabei wurde auch die der C1479 Base ($\text{par}^r\text{-454}$ Mutationsort) entsprechende Base, nämlich C1409, im 16S rRNA Gen von *E. coli* von C nach A geändert. Dadurch wird an dieser Stelle die Stammstruktur der 16S rRNA von *E. coli* um ein Basenpaar verkürzt (siehe Abb.16). Dies entspricht der Situation in Mitochondrien, da die $\text{par}^r\text{-454}$ Mutation an entsprechender Stelle innerhalb der 15S rRNA ebenso diese Stammstruktur um ein Basenpaar verkürzt. Es konnte gezeigt werden, daß durch den Basenaustausch C→A im Gen der 16S rRNA die Translationsrate von Ribosomen, die diese rRNA enthielten, um ca. 80% reduziert wurde. Eine Zweitmutation von G→T an Pos. 1491 der 16S rRNA, welche die Stamm-Struktur rekonstituierte (d.h. C-G → A-U, siehe Abb.16) konnte die ribosomale Aktivität nur teilweise wiederherstellen. Dies bedeutet, daß die C-Base an Pos. 1409 selbst für die Funktion der Translation

eine entscheidendere Rolle spielt, als die intakte Stamm-Struktur, welche durch die Base an dieser Stelle gewährleistet wird.

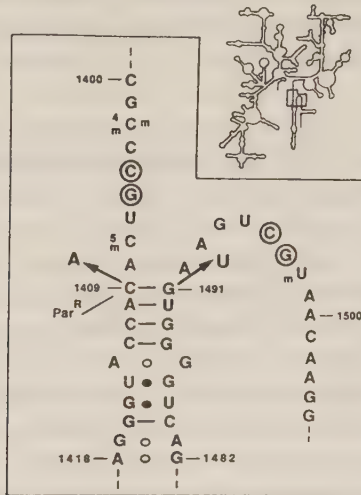


Abb.16 : 3'-Ende der 16S rRNA von *E.coli* (nach De Stasio et al., 1989)

Angezeigt sind die von Hui et al. (1988) durchgeführten Basenänderungen C nach A an Pos.1409 sowie G nach U an Pos.1491, wobei Pos.1409 der Stelle der mitochondrialen *par^r-454* Mutation entspricht (*Par^R*); durch Kreise markiert sind die Basen, welche nach dem Modell von Noller et al. (1985) zusätzlich Basenpaarungen ausbilden können.

Im Gegensatz zu Hui et al. (1988) ergaben die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit keine drastische Reduzierung der Translationsrate durch die *par^r-454* Mutation innerhalb des 16S rRNA Genes. Der Basenaustausch C→G dieser Mutation liegt an entsprechender Stelle zur C-Base an Pos.1409 der 16S rRNA von *E. coli*. Mehrere Befunde sprechen dafür, daß die *par^r-454* Mutation die Translationsrate in Mitochondrien nicht wesentlich beeinflusst. Dies zeigen sowohl Zellen des Stammes KL14-4A als auch reduziert leaky wachsende Zellen, die beide die *par^r-454* Mutation in ihrem mitochondrialen Genom enthalten.

Zum einen wird aus der Bestimmung der Wachstumskurven ersichtlich, daß Stämme, die nur die $\text{par}^{\text{r}}\text{-454}$ Mutation tragen (wie der Stamm KL14-4A), in ihrem Wachstum auf nicht vergärbaren Medien nicht von Wildtypzellen unterschieden werden können (Ergebnisse nicht gezeigt).

Zum anderen weisen reduziert leaky wachsende Zellen eines M5631 Stammes, welche die $\text{par}^{\text{r}}\text{-454}$ Mutation enthalten, alle mitochondrialen Proteine mit Ausnahme der Untereinheit II der Cytochrom-c-Oxidase in Wildtypmengen auf. Diese Untereinheit II der Cytochrom-c-Oxidase wird in einer um 50% geringeren Menge gebildet als in der entsprechenden Ausgangsmutante M5631, welche die $\text{par}^{\text{r}}\text{-454}$ Mutation nicht trägt. Da dieses für die Untereinheit II kodierende Gen in beiden Stämmen die Rasterschubmutation M5631 trägt, bedeutet dies, daß die $\text{par}^{\text{r}}\text{-454}$ Mutation lediglich die Suppression dieser Rasterschubmutation vermindert.

Nachdem die Suppression darauf basiert, einen spontanen Wechsel des Leserahmens zu verursachen, heißt das gleichzeitig, daß die $\text{par}^{\text{r}}\text{-454}$ Mutation spezifisch die Translationsgenauigkeit bezüglich Einhaltung des Leserahmens erhöht und nicht etwa, wie von Hui et al. (1988) in einem entsprechenden Fall beobachtet, die Translationsrate drastisch absenkt.

Allerdings ist es nicht notwendigerweise widersprüchlich, daß die Basenänderung $\text{C} \rightarrow \text{G}$ ($\text{par}^{\text{r}}\text{-454}$ Mutation) im Gen für die mitochondriale 15S rRNA die Translationsgenauigkeit erhöht, während der von Hui et al. (1988) untersuchte Basenaustausch $\text{C} \rightarrow \text{A}$ an entsprechender Stelle im Gen der 16S rRNA von *E. coli* die Translationsrate vermindert. Da Hui et al. (1988) zeigen konnten, daß die C-Base an der entsprechenden Position entscheidender ist als die Stamm-Struktur, welche durch die Mutation verändert wird, mag der Basenaustausch $\text{C} \rightarrow \text{G}$ einen unterschiedlichen Effekt auslösen wie der von obigen Autoren untersuchte Basenaustausch $\text{C} \rightarrow \text{A}$.

Eine andere Erklärung könnte sein, daß der Basenaustausch $\text{C} \rightarrow \text{G}$ der $\text{par}^{\text{r}}\text{-454}$ Mutation auf Grund einer erhöhten Lesegenauigkeit zu einer verstärkten Einhaltung des Tripletteserahmens führt. Lesegenauigkeit ("proof-reading") und Einhaltung des Leserahmens stehen dabei insofern in Beziehung, als nur durch eine korrekt gepaarte Codon-Anticodon-Bindung diese Einhaltung des Leserahmens gewährleistet wird. Bei fehlerhafter Dekodierung eines Co-

dons durch eine nicht cognate tRNA auf Grund eines verminderten "proof-readings" vergrößert sich die Möglichkeit, daß die nicht cognate tRNA außer Phase dekodiert und somit eine Verschiebung des Leserahmens bewirkt (Kurland, 1979). Untersuchungen von Tucker et al. (1989) bestätigen dies, indem sie zeigten, daß auf Grund fehlerhafter Dekodierung durch bestimmte tRNA Mutationen gleichzeitig die Rasterschubrate signifikant erhöht wurde.

Falls also die *par^r-454* Mutation tatsächlich das "proof-reading" und damit gleichzeitig die Einhaltung eines vorgegebenen Leserahmens erhöht, könnte dies auch eine gewisse Senkung der Translationsrate nach sich ziehen, da durch das vermehrte "proof reading" für jede Codon-Anticodon Erkennung mehr Zeit aufgewendet wird. Zwar sprechen die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse gegen eine drastische Reduzierung der Translationsrate wie von Hui et al. (1988) beobachtet, aber die verwendeten Methoden (Wachstumskurven, Analyse der mitochondrialen Proteine) schließen eine geringere Reduzierung der Translationsrate nicht aus.

Die enge Korrelation zwischen Translationsgenauigkeit und Reduzierung der Translationsrate legen auch Untersuchungen über ribosomale Proteinmutanten von *E. coli* dar, welche Antibiotikaresistenz analog der *par^r-454* Mutation verursachen. Diese ribosomalen Mutationen erhöhen dabei - ebenso wie die *par^r-454* Mutation - die Translationsgenauigkeit in den betreffenden Zellen (siehe Review-Artikel Gorini, 1974; Piepersberg et al., 1980). Zudem zeigte sich, daß die erhöhte Translationsgenauigkeit Streptomycin-resistenter Mutanten durch eine Verlangsamung der Translationsrate verursacht wurde; diese Verlangsamung konnte auf erhöhtes "proof-reading" während der Codon-Anticodon Wechselwirkung zurückgeführt werden (Ruusala, 1984).

Ausgehend von sogenannten "ram-Mutationen", Mutationen in ribosomalen Proteingenen, welche im Gegensatz zu oben erwähnten Beispielen die Translationsgenauigkeit in *E. coli* erniedrigten, postulierte Ninio (1974) folgendes Modell : durch diese Mutationen wird die Zeit erniedrigt, welche für die Spezifität der Codon-Anticodon Interaktion benötigt wird. Dadurch wird die Translationsgenauigkeit gesenkt. Umgekehrt bewirken Mutationen, welche diese Zeitspanne verlängern und damit die Translation verlangsamen

men (wie etwa die *E. coli*-Antibiotika-Resistenzmutationen und die *par^r-454* Mutation) eine Erhöhung der Translationsgenauigkeit. Insofern stimmen die Befunde über ribosomale Proteinmutanten mit den in dieser Arbeit gefundenen Daten gut überein. Diese Daten besagen, daß die Base an Pos.1479 der mitochondrialen 15S rRNA der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* eine Schlüsselrolle bezüglich der Translationsgenauigkeit einnimmt. Im Moment kann aber über einen molekularen Mechanismus, auf welche Weise diese Base das "proof-reading" und damit die Translationsgenauigkeit beeinflußt, nur spekuliert werden.

So konnten Moazed und Noller (1987) zeigen, daß der Bereich des 16S rRNA Moleküles, dem eine Beteiligung am "proof-reading"-Prozeß zugeschrieben wird (Pos.890-920, Nummerierung nach *E. coli*), auf Tertiärstrukturebene in unmittelbarer Nachbarschaft zur C-1400 Region lokalisiert ist. Ein Basenaustausch wie die *par^r-454* Mutation in der zur C-1400 homologen Region 15S rRNA könnte somit direkt das "proof-reading" beeinflussen und dadurch eine Erhöhung der Lesegenauigkeit verursachen.

Andererseits haben Noller et al. (1985) ein elegantes Modell vorgeschlagen, welches auf molekularer Basis die Rolle der C-1400 Region beschreibt, die dieser Bereich im Dekodierungsprozeß einnimmt. Danach wird die Bildung einer kurzen Stamm-Struktur postuliert (durch Paarung von C1404 und G1405 mit C1496 und G1497, siehe Abb.16), die durch eine korrekte Codon-Anticodonbindung mittels "coaxialem stacking" stabilisiert wird. Eine Zerstörung der Basenpaarung C1409-G1491 (analog der *par^r-454* Mutation, der Autor) würde so die Bildung der angrenzenden "stacking-Struktur" und infolgedessen die Codon-Anticodon Wechselwirkung stören (Hui et al., 1988). Dies könnte somit eine Senkung der Translationsrate zur Folge haben und, nach den oben dargelegten Befunden über ribosomale Proteinmutanten, zur Verlängerung des "proof-reading"- Prozesses führen.

Welches der beiden Modelle zutrifft, kann jedoch zum jetzigen Zeitpunkt nicht geklärt werden. Sowohl eine direkte Interaktion der *par^r-454* Mutation mit der "proof-reading"-Region der 15S rRNA als auch eine Verlangsamung der Codon-Anticodon-Wechselwirkung durch diese Mutation - und damit verbunden eine Erhöhung des "proof-readings" - sind vorstellbar. Beiden Modellen

ist letztlich eine Erhöhung des "proof-readings" durch die *par^r-454* Mutation gemeinsam, was nach den Befunden von Tucker et al. (1989) gleichzeitig zu einer Erhöhung der Translationsgenauigkeit bezüglich der Einhaltung des Leserahmens führt (siehe oben).

Translationsgenauigkeit in Mitochondrien

Die Tatsache, daß die Translationsgenauigkeit in Mitochondrien durch die *par^r-454* Mutation erheblich gesteigert werden kann, ohne daß dies bemerkbare negative Auswirkungen auf die ribosomale Aktivität hat, wirft die Frage auf, warum Mitochondrien eine relativ hohe Fehlerrate ihres Translationsapparates tolerieren und trotzdem in der Lage sind, ihre Funktion aufrechtzuerhalten. Eine Ursache mag darin liegen, daß - wie Thompson und Hearst (1983) vermuteten - in Mitochondrien kein Selektionsdruck herrscht, der auf eine hohe Translationsgenauigkeit abzielt. Denn alle in Mitochondrien synthetisierten Proteine sind in vielen Kopien vorhanden. Auch werden nur eine geringe Anzahl unterschiedlicher Proteine gebildet, sodaß fehlerhafte Proteine leicht durch intakte Kopien ersetzt werden können.

Alle Proteine, die zum explosionsartigen Ansteigen der Fehlerrate führen könnten - ribosomale Proteine (mit Ausnahme des *Var1*-Proteins) und Polymerasen - werden außerhalb der Mitochondrien synthetisiert.

In manchen Fällen werden in Mitochondrien sogar nur zwei von den drei Basen eines Anticodons gelesen, sodaß es nicht überraschen würde, wenn Mitochondrien viele Bestandteile des "proof-reading Apparates" einfach deletiert hätten (Thompson und Hearst, 1983). Somit wird also verständlich, warum gerade in Mitochondrien der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* eine spontane Verschiebung des Leserahmens beobachtet werden kann, ohne daß dies lethale Folgen für die Hefezelle hat.

Rasterschubsuppression als Mechanismus der Expression von Genen

Eine reduzierte Translationsgenauigkeit, welche eine spontane Verschiebung des Leserahmens ermöglicht, wird nicht nur in Mitochondrien, sondern auch in anderen Organellen und Organismen gefunden. Hier erweist sich die Rasterschubsuppression - also die spontane Verschiebung des Leserahmens - als Mechanismus zur Genexpression.

So kann das spontane Verschieben des Leserahmens in Retroviren, Prokaryonten und Eukaryonten zur Expression zweier Gene führen, die auf einer mRNA kodiert sind, wobei sich die Leserahmen dieser Gene außer Phase überlappen.

Ein solches Beispiel stellt die Bildung der reversen Transkriptase und des sogenannten Gag-Proteins von Retroviren dar. Die Gene für diese beiden Proteine sind auf einer retroviralen mRNA kodiert, wobei sich ihre Leserahmen überlappen und dabei nicht in Phase zueinander liegen.

Zur Bildung beider Proteine kommt es dadurch, daß die Translation am AUG-Startcodon des Gag-Genes beginnt und dann bis zum Ende dieses Genes fortschreitet. Hier sind nun zwei Möglichkeiten gegeben. Erstens, der Leserahmen bleibt erhalten, dann erfolgt die Termination der Translation am Stopcodon des Gag-Genes, ein funktionales Gag-Protein wird erhalten. Eine zweite Möglichkeit besteht darin, daß spontan vor diesem Stopcodon ein Wechsel des Leserahmens in den Leserahmen der reversen Transkriptase erfolgt. Dies ermöglicht ein Durchlesen über das Gag-Stopcodon hinaus bis zum Ende des reversen Transkriptase-Genes (Jacks und Varmus, 1985).

Da der Wechsel des Leserahmens nur in 20% aller Fälle erfolgt, wird daher die reverse Transkriptase in einer 5-fach geringeren Menge synthetisiert als das Gag-Protein. Dies ist sinnvoll, da es sich beim Gag-Protein um ein Hüllprotein des Virus handelt, welches in einer weitaus größeren Menge benötigt wird als das Enzym reverse Transkriptase. Damit erfüllt dieser Mechanismus der Rasterschubsuppression in Retroviren eine regulatorische Funktion. Auch für die Synthese von Releasefaktor 2 (RF2) in *E. coli* ist ein Wechsel des Leserahmens innerhalb der RF2-mRNA Vorausset-

zung. Es konnte gezeigt werden, daß eine interne Shine-Dalgarno Sequenz der RF2-mRNA, welche mit dem 3'-Ende der 16S RNA paart, am Wechsel des Leserahmens beteiligt ist (Weiss et al. 1988).

Diese und andere Beispiele zeigen, daß nicht nur in Mitochondrien, sondern auch in anderen Organellen und Organismen Komponenten des Translationsapparates vorhanden sein müssen, welche eine spontane Verschiebung eines Leserahmens an bestimmten Sequenzen ermöglichen, um zu funktionalen Genprodukten zu gelangen. Bis jetzt konnte aber nicht geklärt werden, ob die in Mitochondrien der Mutante M5631 beobachtete spontane Rasterschub-suppression in Wildtypstämmen zur Synthese funktionaler mitochondrialer Proteine benötigt wird.

Expression der Paromomycinresistenz in den Stämmen M5631 und 777-3A

Im zweiten Teil dieses Kapitels konnte gezeigt werden, daß der Stamm M5631 (und der entsprechende Wildtypstamm 777-3A), trotz Einführung der $\text{par}^r\text{-454}$ Resistenzmutation - ein Basenaustausch C $\rightarrow$ G an Pos.1479 der mitochondrialen 15S rRNA - sensitiv gegen das Antibiotikum Paromomycin bleibt. Allerdings traten nach Integration der $\text{par}^r\text{-454}$ Mutation in das mitochondriale Genom der Stämme M5631, bzw. 777-3A spontan mit einer Häufigkeit von 10^{-4} Paromomycin-resistente Kolonien auf.

Diese hohe Mutationsrate zur Paromomycinresistenz (10^{-4}) wurde dagegen nicht in der Ausgangsmutante M5631, bzw. im zugehörigen Wildtypstamm 777-3A beobachtet, denen die $\text{par}^r\text{-454}$ Mutation fehlt. In diesen Stämmen ohne $\text{par}^r\text{-454}$ Mutation beträgt die Mutationsrate zur Paromomycinresistenz ca. 10^{-7} .

Von diesen Befunden ausgehend, scheint es plausibel, daß die $\text{par}^r\text{-454}$ Mutation in den Stämmen M5631, bzw. 777-3A allein nicht ausreichend ist, um Paromomycinresistenz zu vermitteln, sondern daß diese Mutation erst zusammen mit einer spontan auftretenden Zweitmutation (Mutationsrate 10^{-4}) in den betreffenden Stämmen einen Paromomycin-resistenten Phänotyp zu verursachen vermag.

Somit wirken die *par^r-454* Mutation und die spontan auftretende Zweitmutation synergistisch, wobei jede dieser Mutationen allein nicht in der Lage sein sollte, Paromomycinresistenz zu induzieren, da sonst in Stämmen, welchen die *par^r-454* Mutation fehlt (M5631 bzw. 777-3A), ebenfalls mit einer Häufigkeit von 10^{-4} Paromomycin-resistente Zellen auftauchen müßten. Eine Mutationsrate zur Paromomycinresistenz von ca. 10^{-4} , wie sie in Stämmen auftritt, welche die *par^r-454* Mutation in ihrem mitochondrialen Genom enthalten, scheint außerordentlich hoch zu sein. Jedoch treten derart hohe Mutationsraten durchaus in Mitochondrien auf.

So zeigt etwa die Rasterschubmutation M5631 im *oxi1*-Gen eine Mutations- (d.h. Reversions-)rate von etwa 10^{-3} - 10^{-4} (B.Weiss-Brummer, pers. Mitteilung). Diese Mutation ist durch die Insertion einer T-Base in eine monotone Abfolge von fünf T-Basen gekennzeichnet. Novitski et al. (1983) konnten zeigen, daß die mitochondriale DNA-Polymerase dazu tendiert, an solchen monotonen Sequenzen "auszugleiten", was zu Basen-Insertionen oder Basen-Deletionen führen kann. Daher sind solche monotonen Basenabfolgen besonders anfällig für Mutationen und Rückmutationen. Unter diesem Gesichtspunkt könnte die zusammen mit der *par^r-454* Mutation wirkende Zweitmutation, auf Grund ihrer hohen Mutationsrate, in einer solchen monotonen Basenabfolge lokalisiert sein.

Parallel zu diesen Untersuchungen fanden De Stasio et al. (1989) auch zwei synergistisch wirkende Paromomycinloci in *E. coli*. Allerdings gibt es hier Unterschiede zu Mitochondrien der Hefe *S.cerevisiae*. So bewirkt ein Basenaustausch C→G im Gen der 16S rRNA von *E. coli* an einer der *par^r-454* Mutation entsprechenden Stelle (Pos.1409, Nummerierung nach *E. coli*), daß *E. coli* Zellen, welche diese Mutation tragen, nicht lebensfähig sind (im Gegensatz zu Mitochondrien, welche durch die *par^r-454* Mutation nicht in ihrer Funktion beeinträchtigt sind).

Jedoch wird durch eine nicht lokalisierte Zweitmutation die Überlebensfähigkeit dieser Zellen wiederhergestellt, wobei diese dann gleichzeitig eine 4-fach höhere Resistenz gegen gegen Paromomycin aufweisen als der Paromomycin-sensitive Ausgangsstamm (De Stasio et al., 1989). Diese Daten bestätigen somit nicht nur die in dieser Arbeit gefunden Ergebnisse, sondern zeigen gleichzeitig die funktionale Verwandtschaft der mitochondrialen 16S rRNA der

Stämme M5631, bzw. 777-3A mit der 16S rRNA von *E. coli* an, was ihre Paromomycinresistenz anbelangt.

In den Stämmen KL14-4A, bzw. D273-10B andererseits genügt die $\text{par}^{\text{r-454}}$ Mutation allein, um Paromomycinresistenz zu bewirken (Li et al., 1982; Tabak et al., 1982). Auf Grund des ribosomalen Wirkortes des Antibiotikums Paromomycin mag dies auf strukturellen Unterschieden in Komponenten des mitochondrialen Translationsapparates in den verschiedenen Stämmen zurückzuführen sein.

Auch innerhalb des Stammes KL14-4A selbst konnten unterschiedliche Paromomycinloci beobachtet werden; so sind Mutanten dieses Stammes trotz Abwesenheit der $\text{par}^{\text{r-454}}$ Mutation in der Lage auf Paromomycin-haltigen Medien zu wachsen (Tabak et al., 1982). Aus diesem Befund vermuteten obige Autoren, daß mehr als ein Paromomycinlocus im Stamm KL14-4A existieren könnte. Auf Grund des Antibiotika-Wirkortes kommen als mögliche Resistenzloci daher die Gene für ribosomale Proteine und andere Komponenten des mitochondrialen Translationsapparates (21S rRNA, tRNAs) in Frage.

Zusammengefaßt zeigen die Ergebnisse dieses Kapitels, daß die $\text{par}^{\text{r-454}}$ Mutation allein nicht genügt, um in den Stämmen M5631, bzw. 777-3A Paromomycinresistenz zu induzieren; diese Resistenz kann jedoch zusammen mit einer spontan auftretenden, nicht näher lokalisierten Zweitmutation innerhalb der Stämme M5631 und 777-3A erreicht werden.

Andererseits ist die $\text{par}^{\text{r-454}}$ Mutation im Gen der mitochondrialen 15S rRNA der Rasterschubmutante M5631 ausreichend, um die Translationsgenauigkeit in Mitochondrien zu erhöhen und somit die natürliche Rasterschubsuppression dieses Stammes signifikant zu erniedrigen.

KAPITEL II :

EINE NEUE CLUSTER SPEZIES IN MITOCHONDRIEN : SPEZIFISCHE AT-CLUSTER INSERTIONEN IN DER MITOCHONDRIALEN 15S rRNA DER HEFE *SACCHROMYCES CEREVISIAE*

Einführung

Wie in Kapitel I gezeigt werden konnte, beeinflußt die mitochondriale 15S rRNA der Hefe *S. cerevisiae* entscheidend den Grad der Translationsgenauigkeit in Mitochondrien dieses Stammes. Voraussetzung für diese Aussage war unter anderem die Übertragung der Struktur und Funktion der 16S rRNA von *E. coli* auf das 15S rRNA Molekül in Mitochondrien. Da bis dahin noch kein ausgearbeitetes Sekundärstrukturmodell der mitochondrialen 15S rRNA der Hefe *S. cerevisiae* vorlag, wurde ein solches an Hand der 16S rRNA Sekundärstruktur von *E. coli* ausgearbeitet.

Gleichzeitig war beabsichtigt, die 15S rRNA Gene der Hefestämme KL14-4A und M5631 aus dem vorangegangenen Kapitel miteinander und mit bereits sequenzierten 15S rRNA Genen anderer Wildtypstämme zu vergleichen.

Wie bereits gezeigt, unterscheiden sich die 15S rRNA Gene der Stämme KL14-4A und M5631 durch die An- bzw. Abwesenheit der par^r-454 Mutation am 3'-Ende der 15S rRNA. Es war beabsichtigt zu untersuchen, ob noch weitere Sequenzunterschiede in diesen Genen beobachtet werden können. Ein besonderes Augenmerk sollte dabei auf das Vorhandensein sogenannter Cluster-Insertionen gelegt werden. Innerhalb des 15S rRNA Genes des Stammes MH41-7B wurde nämlich von Sor und Fukuhara (1982a) an Pos.442 ein optionales GC-Cluster von 38bp Länge identifiziert, welches in anderen Wildtypstämmen nicht auftrat (dies wurde durch Restriktionsanalysen nachgewiesen).

Als GC-Cluster werden dabei solche Sequenzbereiche des mitochondrialen Genomes bezeichnet, welche im Gegensatz zu den anderen Bereichen einen außerordentlich hohen GC-Gehalt (ca.60%) besitzen; diese GC-Cluster nehmen etwa 10% des mitochondrialen Genomes ein (Prunell und Bernardi, 1974). Da diese Cluster optional sind und

an verschiedensten Stellen des mitochondrialen Genomes gefunden werden, wird von mehreren Autoren ein Modell diskutiert, nachdem sich derartige Sequenzbereiche als transposable Elemente verhalten, welche an bestimmten Stellen dieses Genomes integrieren können (de Zamaroczy und Bernardi, 1986a; G. Weiller, 1987).

Generell sind mobile Elemente darauf spezialisiert miteinander zu rekombinieren, was zum Verlust des dazwischenliegenden DNA-Bereiches und zur Verknüpfung (Ligation) der Randsequenzen führt. Durch die Ligation verschiedener Domänen können so in rascher Folge Gene für neue Proteine erzeugt werden. Somit kommt transposablen (mobilen) Elementen eine funktionelle Bedeutung zu und ihre Untersuchung ist daher von Interesse.

Da das mitochondriale Genom zu über 50% aus AT-reichen "Spacer-Regionen" (95%AT) aufgebaut ist (de Zamaroczy und Bernardi, 1986b, 1987), stellte sich die Frage, ob neben mobilen GC-Clustern auch AT-Cluster in Mitochondrien existieren, welche sich als transposable Elemente verhalten. Dies ist nicht leicht zu beantworten, da die Möglichkeit besteht, daß diese AT-Cluster - im Gegensatz zu GC-Clustern - wegen des hohen AT-Gehaltes der meisten mitochondrialen Regionen nicht als solche erkannt werden könnten. Andererseits sollten AT-Cluster Insertionen in Sequenzbereichen mit moderatem GC-Gehalt nicht toleriert werden, da in Mitochondrien solche Bereiche zumeist kodierende Regionen repräsentieren.

Gene für ribosomale RNAs stellen deshalb geeignete Zielsequenzen (sogenannte "Targetsites") für GC- und (putative) AT-Cluster Insertionen dar, da durch Insertionen in diesen Genen keine Zerstörung eines Leserahmens erfolgen kann. Falls zudem die Cluster in solche Bereiche des rRNA Genes integrieren, welchen keine funktionale Bedeutung zukommt, besteht die Möglichkeit, daß diese Fremdsequenzen toleriert und weitervererbt werden.

Tatsächlich konnten erstmals bei Vergleich der 15S rRNA Gene der Stämme KL14-4A, bzw. M5631 mit den 15S rRNA Genen der Stämme MH41-7B, bzw. D273-10B/A21 optionale AT-Cluster Insertionen von 16bp Länge identifiziert werden. Zwei zusätzliche, invariante AT-Cluster wurden bei Vergleich der mitochondrialen 15S rRNA mit der 16S rRNA von *E. coli* gefunden.

Ergebnisse

1. DNA-Sequenz der 15S rRNA Region der Stämme M5631, 777-3A und KL14-4A

1.1 Kartierung des 15S rRNA Genes durch Southernblotting

Die Klonierung des 15S rRNA Genes erforderte zunächst eine genaue Bestimmung seiner Lage im mitochondrialen Genom. Von Martin et al. (1982a) konnte gezeigt werden, daß das 15S rRNA Gen des Stammes D243-2B-2R₁ innerhalb eines ca. 2000bp langen HpaII-Fragments lokalisiert ist.

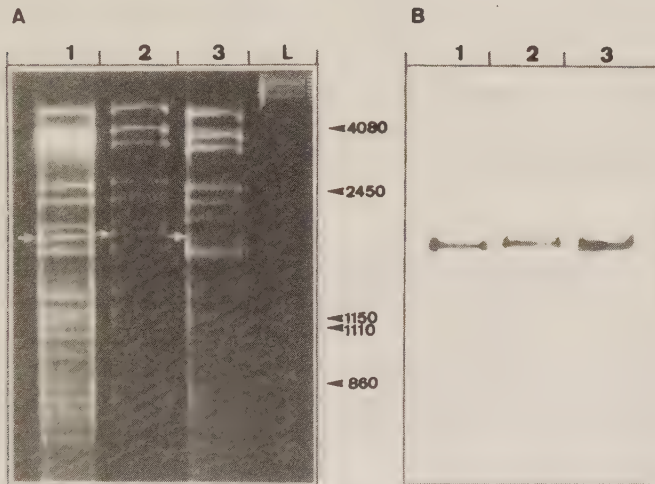


Abb.17 : Kartierung des 15S rRNA Genes durch Southernblotting

A) HpaII-Restriktion der mitochondrialen DNA der Hefestämme M5631, 777-3A und KL14-4A; die mitochondriale DNA wurde aus den jeweiligen Stämmen isoliert, mit HpaII verdaut und die Restriktionsfragmente in einem 1.5%-igen Agarosegel aufgetrennt. Spur 1 : M5631; Spur 2 : 777-3A; Spur 3 : KL14-4A; L : Längenmarker, DNA des Phagen P22, welche mit EcoRI verdaut wurde.

B) Hybridisierung der auf Nitrocellulose transferierten Restriktionsfragmente mit einem nicktranslatierten Fragment (540bp Sau3A-Sau3A, vgl. Abb.8) des 15S rRNA Genes. Spur 1 : M5631; Spur 2 : 777-3A; Spur 3 : KL14-4A.

Auf Grund dieser Daten wurde die mitochondriale DNA aller drei Stämme isoliert und mit dem Restriktionsenzym HpaII geschnitten (Abb.17A). Nach Auftrennung in einem 1.5%-igen Agarosegel wurden die Restriktionsfragmente auf Nitrocellulose transferiert (siehe Material und Methoden).

Aus dem rho-Stamm P2 (abstammend vom rho⁺-Stamm MH41-7B, erhalten von Dr. Fukuhara), dessen mitochondriales Genom nur die 15S rRNA Region enthält, wurde ein 540bp langes Sau3A-Fragment aus dem 15S rRNA Gen isoliert (Sor und Fukuhara, 1982a). Dieses Fragment wurde nicktranslatiert und mit den auf Nitrocellulose transferierten Restriktionsfragmenten der Stämme KL14-4A, 777-3A und M5631 hybridisiert (siehe Material und Methoden).

Auf Grund der Hybridisierungsdaten konnte das 15S rRNA Gen in diesen Stämmen - wie von Martin et al. (1982a) im Stamm D243-2B-R₁ beschrieben - auf einem ca. 2000bp langen HpaII-Fragment lokalisiert werden (Abb.17B).

1.2 Klonierung der 2000bp HpaII-Fragmente in das Plasmid pUC19

Aus den jeweiligen Stämmen wurde das 2000bp HpaII-Fragment zur Amplifikation des mitochondrialen Anteils in ein mit AccI geschnittenes pUC19-Plasmid einkloniert (siehe Material und Methoden). Nach Amplifikation des Plasmides wurde das mitochondriale 2000bp-Fragment durch HpaII Restriktionsverdau wieder aus der Plasmid-DNA exzisiert und über einem 1.5%-igen Agarosegel von den Plasmidfragmenten abgetrennt (siehe Material und Methoden).

1.3 Subklonierung der 2000bp HpaII-Fragmente

Die 2000bp HpaII-Fragmente der Stämme KL14-4A, M5631 und 777-3A wurden jeweils mit Sau3A, bzw. TaqI geschnitten und die Restriktionsfragmente in einem 1.5%-igen Agarosegel aufgetrennt. Die jeweils erhaltenen Subfragmente wurden in den M13 Vektor mp9 einkloniert, welcher mit BamH1 (für Sau3A-Fragmente), bzw. mit AccI (für TaqI-Fragmente) geschnitten wurde. Die Sequenzie-

rung der Fragmente erfolgte nach der Kettenabbruchmethode von Sanger et al., 1977 (siehe Material und Methoden). In Abb.18 ist die Sequenzierungsstrategie des 15S rRNA Genbereiches zusammengefaßt.

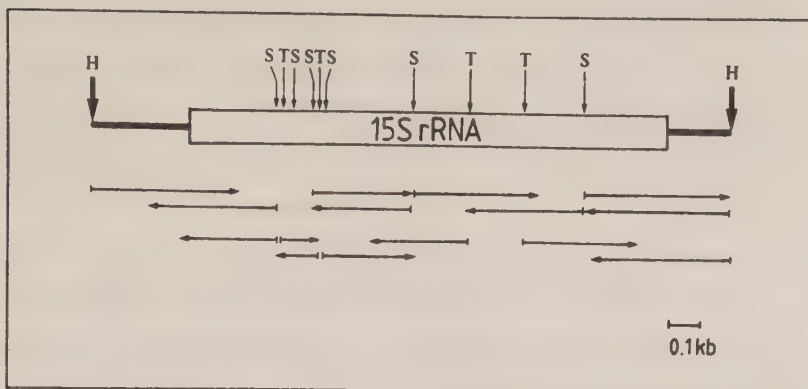


Abb.18 : Strategie zur Bestimmung der Sequenz des 15S rRNA Genes

Richtung und Länge der durchgeführten Sequenzierungen sind durch Pfeile angedeutet; H=HpaII; S=Sau3A; T=TaqI.

1.4 DNA-Sequenz der 15S rRNA Gene der Stämme M5631, 777-3A und KL14-4A

In Abb.19 ist die Sequenz des Wildtypstammes 777-3A und der daraus abgeleiteten Mutante M5631 sowie des Stammes KL14-4A gezeigt. Es treten keine Sequenzunterschiede innerhalb der 15S rRNA Gene der Stämme 777-3A und M5631 auf; dies bestätigt die genetischen Befunde von Weiss-Brummer et al. (1987), die darauf hindeuteten, daß die Mutante M5631 außer ihrer Rasterschubmutation im oxil-Gen keine Zweitmutation trägt, und ihr 15S rRNA Gen somit mit der Wildtypsequenz des Mutterstammes 777-3A identisch ist. Im folgenden wird deshalb bei allen weiteren Betrachtungen nur noch auf die Sequenz des Wildtypstammes 777-3A Bezug genommen.

1 AGTAAAAATTTTATAAGAATATGATGTTGGTTCAGATTAGCGCTAAATAAGGACATGACACATGCGAATCATACGTTTA
 81 TTATTGATAAGATAATAAATATGTGGTGTAACCGTGAGTAATTTTATTAGGAATTAATGAACATATAGAATAAGCTAAATA
 161 CTTAATATATTATTATATAAAAAAATTTATATAATAAAAAAGGATATATATATAATATATATTTATCTATAGTCAAGCCA
 241 ATAATGTTTAGGTAGTAGGTTTATTAAGAGTTAAACCTAGCCAACGATCCATAATCGATAATGAAAGTTAGAACGATCA
 321 CGTTGACTCTGAAATATAGTCAATATCTATAAGATACAGCAGTGAGGAATATTGGCAATGATCGAAAGATTGATCCAGT
 401 TACTTATTAGGATGATATATAAAAAATTTTTATTTTATTTATAAATATTAATATTTTATAATAATAATAATAATATA
 481 TATATATAAATTGATTAATAAATAAATCCATAAATAATTAATAATGATATTAAATACCATATATATTTTATATGGA
 561 TATATATATTAATAATAATATTAATTTTATTATTATTAATAATATATTTTAATAGTCCTGACTAATATTGTGCCAGCAG
 641 TCGCGGTAAACAAAAGGGCGAGCGTTAATCATAATGGTTTAAAGGATCCGTAGAATGAATTATATATTATAATTTAGA
 721 GTTAATAAAATATAAATTAAAGAAATTATAATAGTAAAGATGAAATAATAATAATTTATAAGACTAATATATGTGAAAT
 801 ATTAATTAATATTAACATGACATTGAGGGATTAAAACTAGAGTAGCGAAACGGATTGATACCCGTGTAGTTCTAGTAGT
 881 AAACTATGAATACAATTATTTTATAATATATATTATATATAAATAATAAATGAAATGAAAGTATTCACCTGAAGAGTAC
 961 GTTAGCAATAATGAAACTCAAAACAATAGACGGTTACAGACTTAAGCAGTGAGCATGTTATTTAATTCGATAATCCAGC
 1041 ACTAACCTTACCATATTTTGAATATTATAATAATTAATTATTATAATTATTATATTACAGCGGTTACATTGTTGCTTTAGTTC
 1121 GTGCTGCAAAGTTTGTAGATAATGTTTCATAAACGAACAAAACTCCATATATATAATTTAATTATATATAATTTTATTA
 1201 TTTATTAATATAAAGAAAGGAATTAAAGACAAATCATAATGATCCTTATAATATGGGTAATAGACGTGCTATAATAAAATG
 1281 ATAATAAAATATATAAAATATATTTAATTATATTTAATTAAATATAATAAACAATTTTAATTTTAAATATATTTTTTAT
 1361 TATATATTAATATGAATTATAATCTGAAATTCGATTATATGAAAAAAGAATTGCTAGTAATACGTAAATTAGTATGTTAC
 1441 GGTGAATATTCTAAGCTTTTCGCACTAATCACTCATCA^{*}CGGTTGAAACATATTATCTTATTATTATATAATATT
 1521 TTTAATAAATATTAATAATTATTAATTTTATTTATTTATATATCAGAAAAATATGAATTAATGCGAAGTTGAAATACAGT
 1601 TACCGTAGGGGAACCTGCGGTGGGCTTATAAATATCTTAAATATTCTTACA

Abb.19 : DNA-Sequenz des 15S rRNA Genes im Stamm 777-3A

Sequenzunterschiede zum 15S rRNA Gen des Stammes KL14-4A sind durch Sterne angezeigt; (-) bedeutet Deletion einer Base; die Basensequenz des AT-Clusters ATCL1 (siehe Text) ist unterstrichen.

Im Vergleich zum Stamm 777-3A weist der 15S rRNA kodierende Bereich des Stammes KL14-4A drei Sequenzunterschiede auf. Dies

ist durch die Deletion einer T-Base an Pos.553 und die Deletion einer A-Base an Pos.732 bedingt (Nummerierung im Stamm 777-3A, siehe Abb.19). Ein dritter Unterschied zum 777-3A Gen ist der Basenaustausch C (777-3A) nach G (KL14-4A) an Pos.1479 der 15S rRNA (Nummerierung im Stamm 777-3A), wie in Abb.19 gezeigt. Dieser Basenaustausch wurde bereits im vorigen Kapitel als die par^r-454 Mutation beschrieben.

Außer diesen drei Unterschieden sind die kodierenden Sequenzen der 15S rRNA Gene in den Stämmen 777-3A und KL14-4A vollkommen identisch.

2. Bestimmung des 5'-Endes der 15S rRNAs der Stämme 777-3A und KL14-4A

Die S1-Kartierung zur Bestimmung der 5'-Enden wurde, wie in Material und Methoden beschrieben, durchgeführt. Gesamt mitochondriale RNA der Stämme 777-3A bzw. KL14-4A wurde mit einem 5'-endmarkierten HinfI-HpaII Fragment hybridisiert, welches - nach Li et al. (1982) - das 5'-Ende der reifen 15S rRNA enthielt (ermittelt im Stamm D273-10B/A21).

Nach Verdau mit S1-Nuklease wurden die erhaltenen Fragmente auf einem 6%-igen Acrylamidgel aufgetragen. Als Vergleichssequenz zur Längenbestimmung der Fragmente wurden die Sequenzreaktionen eines pUC19-Vektors gewählt (Abb.20).

In beiden Stämmen - 777-3A und KL14-4A - finden sich je zwei unterschiedlich lange Transkripte der 15S rRNA. Der Startpunkt des um ca. 80bp längeren Transkriptes läßt sich einer für Mitochondrien typischen Promotorsequenz zuordnen : 5'.....ATATAAGTA.....3'. Die Transkription des 15S rRNA-Genes scheint nicht an einer bestimmten Base, sondern heterogen an fünf aufeinanderfolgenden Basen zu initiieren (Abb.20 und 21). Die Existenz einer Prekursorform der reifen 15S rRNA wurde von Christianson et al. (1982) und von Li et al. (1982) in den Stämmen MH41-7B, bzw. D273-10B/A21 bereits gezeigt. Auch legten diese Autoren dar, daß die Prozessierung des 15S rRNA-Prekursortranskriptes ungenau erfolgt : das Prekursortranskript wird heterolog an fünf aufeinanderfolgenden Basen 80bp "downstream" vom Transkriptionsstartpunkt geschnitten.

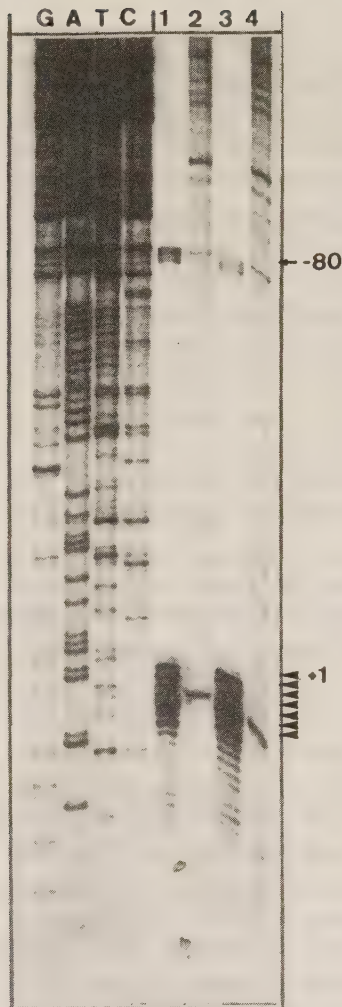
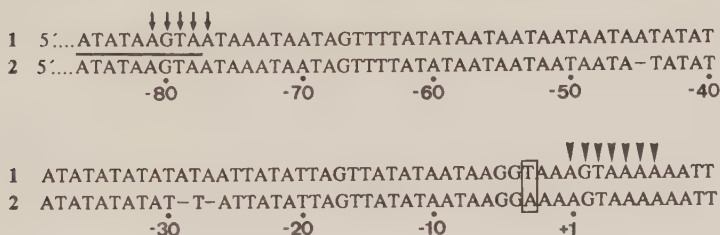


Abb.20 : S1-Kartierung der 5'-Enden der 15S rRNA der Stämme 777-3A und KL14-4A

Mitochondriale RNA der jeweiligen Stämme wurde mit einem endmarkierten HpaII-HinfI Fragment hybridisiert, welches das putative 5'-Ende der 15S rRNA enthielt (nach Li et al., 1982); der jeweilige Hybridisierungsansatz wurde mit S1-Nuklease verdaut und die protegierten Fragmente anschließend in einem 8%-igen Polyacrylamid-Harnstoff-Gel aufgetrennt; als Längenmarker wurde eine bekannte Nukleotidsequenz verwendet (G, A, T, C). Spur 1 : 777-3A; Spur 2 : Kontrolle ohne S1-Verdau; Spur 3 : KL14-4A; Spur 4 : Kontrolle ohne S1-Verdau; der Transkriptionsstart (-80) und die erste prozessierte Base (+1) der reifen 15S rRNA sind angezeigt.

Wie in Abb.21 gezeigt, trifft dies auch bei den in dieser Arbeit untersuchten Stämmen 777-3A und KL14-4A zu, mit dem Unterschied, daß statt an fünf an sieben aufeinanderfolgenden Basen geschnitten wird. Da Christianson et al. (1982) eine Sequenzierung des 5'-Endes durchführten, die obigen Ergebnisse aber nur auf einer S1-Kartierung beruhen, kann nicht ausgeschlossen werden, daß die beiden zusätzlich gefundenen Prozessierungsstellen auf S1-Artefakte zurückzuführen sind.



**Abb.21 : Promotorbereich der 15S rRNA im Stamm 777-3A (1)
bzw. KL14-4A (2)**

Der heterologe Transkriptionsstart an Pos. -80 (Nummerierung im Stamm 777-3A) sowie die Prozessierungsstellen der 15S rRNA (+1 und folgende) sind durch Pfeile markiert, die Promotorsequenz ist unterstrichen; Sequenzunterschiede im Promotorbereich zwischen den Stämmen 777-3A und KL14-4A sind durch - (Basendeletion), bzw. durch Umrandung (Basenaustausch) gekennzeichnet.

Obwohl sich die Sequenzen der Stämme 777-3A und KL14-4A an einigen Positionen im Bereich zwischen Transkriptionsstart und Beginn der reifen 15S rRNA unterscheiden (Abb.21), sind Transkriptionsstartpunkte und Prozessierungsstellen in beiden Stämmen vollkommen identisch. Die beobachteten Sequenzunterschiede in diesem Bereich scheinen also für Transkription und Prozessierung der 15S rRNA nicht von Bedeutung zu sein.

3. Sekundärstrukturmodell der 15S rRNA

Um Bereiche der mitochondrialen 15S rRNA und der 16S rRNA von *E. coli* auf struktureller und funktioneller Ebene miteinander vergleichen zu können (z.B. im Bezug auf die "C-1400 Region" aus dem vorigen Kapitel), wurde ein Sekundärstrukturmodell der 15S rRNA des Stammes 777-3A ausgearbeitet (siehe Abb.22).

Es sollte darauf hingewiesen werden, daß bei der Aufstellung dieses Sekundärstrukturmodelles vergleichend vorgegangen werden muß. Man darf nicht generell die vom thermodynamischen Standpunkt aus optimal stabilen Strukturen als relevant werten, sondern solche, welche sich im Vergleich mit anderen Organismen (z.B. *E. coli*) bestätigen. Hierbei wird eine mögliche Sekundärstruktur dadurch getestet, daß die betroffene Region mit dem entsprechenden Bereich der 16S rRNA von *E. coli* verglichen wird. Wenn der zu untersuchende Helixbereich sich als korrekt erweisen soll, dann müssen Sequenzunterschiede zwischen den beiden rRNA-Spezies durch sogenannte kompensatorische Basenaustausche ausgeglichen werden, um Helixstrukturen zu erhalten.

Falls z.B. eine G-Base im Helixstrang einer rRNA-Spezies in einer anderen Spezies in eine A-Base umgewandelt wurde, dann muß die entsprechende C-Base des gegenüberliegenden Stranges durch eine U-Base ersetzt worden sein (G-C $\rightarrow$ A-U). Somit war es möglich, ein Modell der mitochondrialen 15S rRNA der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* aufzustellen. Wie in Abb.24 zu sehen, sind die Sekundärstrukturen der mitochondrialen 15S rRNA und der 16S rRNA von *E. coli* außerordentlich ähnlich (auf Strukturunterschiede wird zu einem späteren Zeitpunkt eingegangen).

Insbesondere der 3'-kodierende Bereich des Moleküles ("C-1400 Region") ist zwischen beiden ribosomalen RNAs hochkonserviert. Diese Region wird auf Grund einer Fülle verschiedener Daten als Dekodierungszentrum innerhalb der 16S rRNA von *E. coli* angesehen (vgl. Kapitel I). Die hohe strukturelle Verwandtschaft der mitochondrialen 15S rRNA mit der 16S rRNA von *E. coli* läßt darauf schließen, daß entsprechende Bereiche sehr wahrscheinlich gleiche Funktionen haben (siehe auch Diskussion).

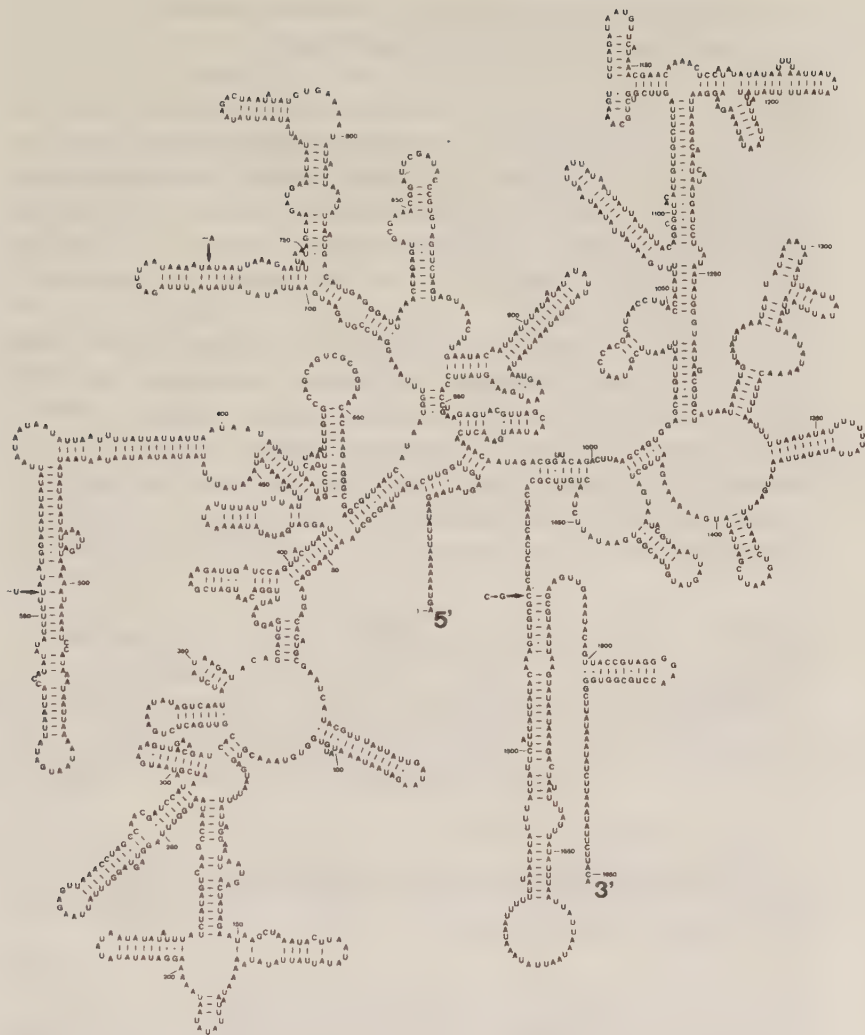


Abb.22 : Sekundärstrukturmodell der 15S rRNA des Stammes 777-3A

Die Faltung der 15S rRNA wurde auf der Basis des 16S rRNA Sekundärstrukturmodells von *E. coli* durchgeführt. Sequenzunterschiede zwischen den Stämmen 777-3A und KL14-4A sind durch Pfeile angezeigt.

4. Eine neue Cluster-Spezies in Mitochondrien : optionale AT-Cluster Insertionen

Wie in Abb.19 gezeigt, unterscheiden sich die Stämme KL14-4A und 777-3A nur an drei Positionen innerhalb ihrer 15S rRNA Gene. Vergleicht man die 15S rRNA Gene dieser Stämme mit bereits sequenzierten mitochondrialen 15S rRNA Genen der Stämme MH41-7B (Sor und Fukuhara, 1982a), bzw. D273-10B/A21 (Li et al., 1982), dann findet man 15 einzelne und einen zweifachen Basenaustausch (Ergebnisse nicht gezeigt).

Außer diesen minoren Sequenzunterschieden wurden durch diesen Vergleich erstmals optionale AT-Cluster Insertionen von 16bp Länge identifiziert. Diese Cluster sind in den Stämmen 777-3A, KL14-4A und D273-10B/A21 an Pos.1179-1194 (Nummerierung im Stamm 777-3A) des 15S rRNA Genes integriert, während im Stamm MH41-7B eine solche Insertion nicht beobachtet werden kann (siehe Abb.23).

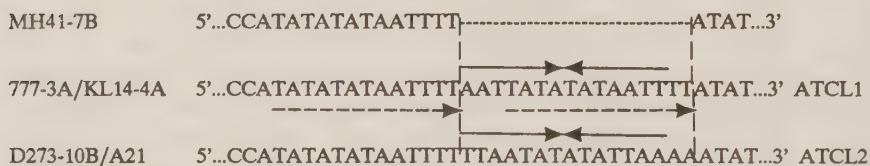


Abb.23 : Optionale AT-Cluster ATCL1 und ATCL2

Ausschnitt aus der DNA-Sequenz der 15S rRNA der Stämme MH41-7B, 777-3A, KL14-4A und D273-10B/A21; durchgehende Pfeile zeigen "inverted repeats", unterbrochene Pfeile "direct repeats" an. ATCL1 und ATCL2 sind innerhalb der vertikalen Linien lokalisiert.

Die inserierten Sequenzen weisen einige auffällige Besonderheiten auf. So bestehen sie nur aus AT-Basen (im Gegensatz zu GC-Clustern, die einen außerordentlich hohen GC-Gehalt aufweisen). Die Insertionen sind in den Stämmen 777-3A und KL14-4A vollkommen identisch : 5'.....AATTATATATAATTTT.....3' (siehe Abb.23). Diese Sequenz wird im weiteren als ATCL1 (AT-Cluster1) bezeichnet.

Im Stamm D273-10B/A21 befindet sich an Stelle des ATCL1 an gleicher Position die Basenabfolge : 5'.....TTAATATATATATATATATATAT...3'

(siehe Abb.23). Diese Sequenz, im weiteren als ATCL2 (AT-Cluster2) bezeichnet, steht mit dem ATCL1 der Stämme 777-3A und KL14-4A insofern in Beziehung, als daß ATCL2 zwar von seiner Basenabfolge her die komplementäre Sequenz zu ATCL1 darstellt, aber wegen gleicher 5'→3'-Orientierung nicht als komplementäre Sequenz bezeichnet werden kann. ATCL2 ist vielmehr eine sogenannte "Spiegelkopie" von ATCL1 (Abb.23). Der Stamm MH41-7B enthält weder ATCL1 noch ATCL2 an der Insertionsstelle (Abb.23). Verglichen mit den Stämmen 777-3A, KL14-4A und D273-10B/A21 sind in diesem Stamm also 16bp deletiert.

Die Insertionssequenzen ATCL1 und 2 zeigen noch andere ungewöhnliche Aspekte auf : 14bp der 16bp in ATCL1 bzw. ATCL2 können eine Haarnadelstruktur ("Hairpin-Struktur") auf Grund von 7bp langen "inverted repeats" ausbilden (d.h. diese Sequenzbereiche können mit sich selbst paaren) : 5'.....TTAATATATATTAA.....3' (ATCL1) bzw. 5'.....AATTATATATAATT.....3' (ATCL2). Diese Hairpin-Struktur ist charakteristisch für transposable Sequenzelemente (G. Weiller, 1987).

Ein sogenanntes "direct repeat" der Basen 4-16 von ATCL1 : 5'.....TATATATAATTTT.....3' mit einem Spacerbereich von drei Basen (5'..AAT..3') wird in den Stämmen 777-3A und KL14-4A beobachtet (siehe Abb.23). Diese Sequenz ist in allen vier untersuchten Stämmen (auch im MH41-7B, der weder ATCL1 noch ATCL2 besitzt) unmittelbar vor der 16bp-Insertionsstelle lokalisiert.

5. ATCL3 und ATCL4, zwei weitere, nicht optionale AT-Cluster

Die Sekundärstruktur der 15S rRNA der Hefemitochondrien zeigt, wie bereits erwähnt, ausgesprochen starke Homologien mit der 16S rRNA von *E. coli*, eine Tatsache, die auch für andere 16S ähnliche rRNAs bereits gezeigt werden konnte (Huysmans und De Wachter, 1986). Beim Vergleich der Sekundärstrukturen der kleinen ribosomalen RNAs von *E. coli* (Moazed et al., 1986) und *S. cerevisiae* (Hüttenhofer et al., 1988) wurden zwei weitere invariante AT-Cluster (ATCL3 und ATCL4, siehe Abb.24) gefunden. Diese Insertionen tragen an ihren Enden "inverted repeats" und sind in allen vier un-

tersuchten Hefestämmen vorhanden, fehlen aber in der 16S rRNA von *E. coli*.

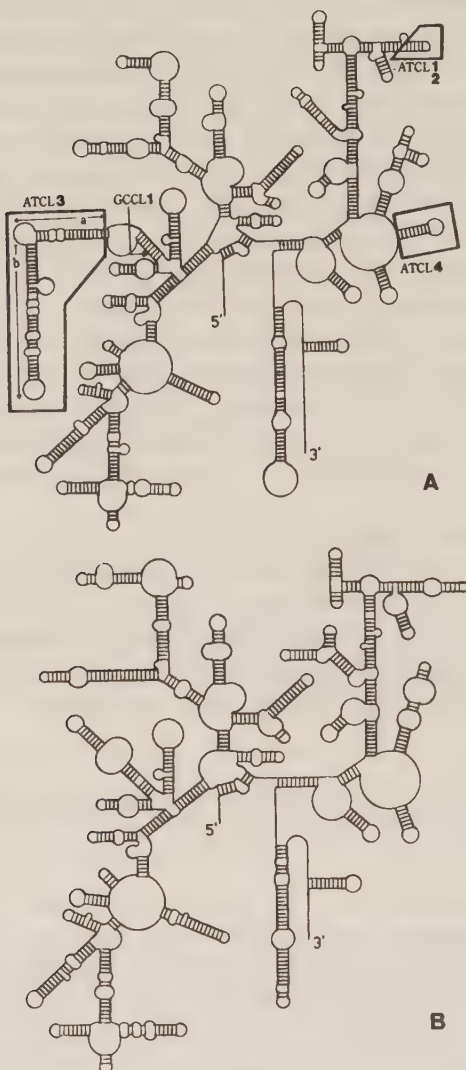


Abb.24 : Sekundärstrukturen der mitochondrialen 15S rRNA der Hefe *S. cerevisiae* und der 16S rRNA von *E. coli*

A) Sekundärstrukturmodell der 15S rRNA des Hefestammes 777-3A; AT-Cluster (1-4) und die Insertionsstelle des GC-Clusters GCCL1 sind angezeigt. B) Sekundärstrukturmodell der 16S rRNA von *E. coli*.

ATCL3 besteht zu 94% aus AT-Basen und weist eine Länge von 140bp auf. Das Cluster ist in eine Region (V3) inseriert, die als variabel in Pro- und Eukaryonten beschrieben wurde (Huysmans und De Wachter, 1986). Auch die Insertion des optionalen GC-Clusters GCCL1 der Stämme D273-10B/A21 und MH41-7B fällt in diese Region (siehe Abb.24).

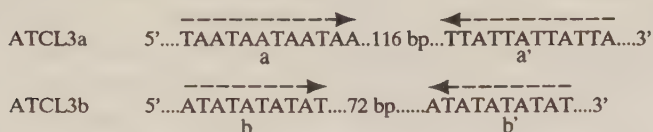


Abb.25 : AT-Cluster ATCL3

Teil der DNA-Sequenz des ATCL3; die "inverted repeats" (a-a'; b-b') sind durch Pfeile markiert.

ATCL3 kann in zwei Sequenzbereiche eingeteilt werden, die jeweils "inverted repeats" an ihren Enden tragen (Abb.25). Jedes Paar "inverted repeats" (a-a'; b-b') ist mehr als 70 Basen voneinander getrennt. Eine denkbare Modell ist, daß im Laufe der Evolution das Cluster ATCL3 durch zwei aufeinanderfolgende Insertionsschritte entstanden ist : zuerst durch Insertion von ATCL3a in die variable Region V3, anschließend durch die Insertion von ATCL3b in ATCL3a. Das zweite invariante Cluster ATCL4 ist 27bp lang und in eine Schleifenstruktur ("loop-Struktur") der 15S rRNA integriert (Pos. 1344-1370, siehe Abb.24), die bis dahin als nicht-variante Region angesehen wurde. Auffallend sind wieder "inverted repeats" an den Enden der Insertionssequenz. Diese zeigen zudem signifikante Homologie mit den "inverted repeats" des ATCL2 (siehe Abb.26).

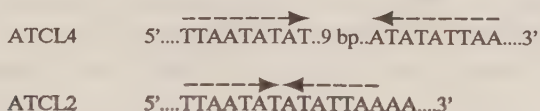


Abb.26 : AT-Cluster ATCL4

Teil der DNA-Sequenz von ATCL4 und ATCL2; Pfeile zeigen die "inverted repeats" in ATCL4 und ATCL2 an.

6. Stellen ATCLs Introns der mitochondrialen 15S rRNA dar?

Um zu ermitteln, ob ATCLs Intronsequenzen der mitochondrialen 15S rRNA darstellen, wurde eine S1-Kartierung der 15S rRNA durchgeführt. Dazu wurde ein 2000bp langes HpaII-Fragment, welches das gesamte 15S rRNA Gen enthielt, mit mitochondrialer RNA der Stämme 777-3A, bzw. KL14-4A hybridisiert, und anschließend mit S1-Nuklease verdaut, wie von Li et al. (1982) beschrieben.

Die Untersuchungen ergaben (Ergebnisse nicht gezeigt), daß das 15S rRNA Gen beider Stämme keine Intronsequenzen enthält; d.h. auch die AT-Cluster ATCL1, ATCL3 und ATCL4 verbleiben in der reifen 15S rRNA. Gleiches wurde für ATCL2 im Stamm D273-10B/A21 nachgewiesen (Li et al., 1982).

Die AT-Cluster verhalten sich also wie GC-Cluster, die optional sind und nicht als Intronsequenzen exzisiert werden (Sor und Fukuhara, 1982b).

7. Optionale GC-Cluster Insertionen

Die zweite Cluster-Insertion, welche bei Vergleich der 15S rRNA Gene der Stämme KL14-4A, 777-3A, MH41-7B und D273-10B/A21 identifiziert werden konnte, ist ein optionales GC-Cluster (GCCL1) an Pos.442, das bereits von Sor und Fukuhara (1982b) beschrieben worden war. Gefunden wird es in den Stämmen D273-10B/A21 und MH41-7B. Dieses Cluster fehlt in den Stämmen 777-3A und KL14-4A (Abb.27). Sor und Fukuhara (1982b) wiesen im Stamm MH41-7B nach, daß dieses optionale GC-Cluster nicht als Intron exzisiert wird, sondern in der reifen 15S rRNA verbleibt. Das GC-Cluster besitzt eine Länge von 38bp und seine Sequenz ist nicht identisch in den beiden Stämmen, in welchen es gefunden wird.

Base 22 des Clusters ist im Stamm D273-10B/A21 ein Adenin, während der Stamm MH41-7B ein Guanin an dieser Position besitzt; Base 26 ist ein Guanin im Stamm D273-10B/A21, im Stamm MH41-7B ein Adenin. An allen übrigen Positionen weisen beide Cluster identische Sequenzen auf.

Ob es sich hier um zwei unterschiedliche GC-Cluster handelt oder um ein und dasselbe, das dann im Laufe der Evolution mutativ verändert wurde, kann nicht eindeutig geklärt werden.

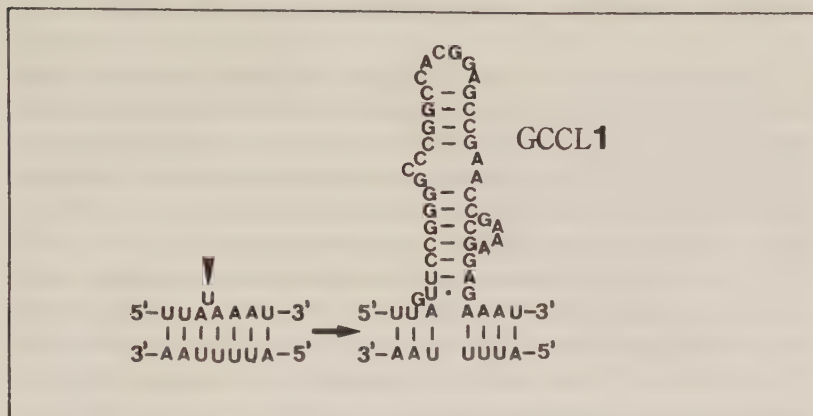


Abb.27 : GC-Cluster GCCL1

Gezeigt ist ein Teil der Sekundärstruktur der 15S rRNA des Hefestammes 777-3A (links), der kein GC-Cluster besitzt bzw. des Stammes MH41-7B (rechts), welcher an der durch einen Pfeil angezeigten Position das GC-Cluster GCCL1 inseriert hat.

Diskussion

Die Sekundärstruktur der mitochondrialen 15S rRNA

Die Sekundärstruktur der mitochondrialen 15S rRNA der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* weist außerordentlich hohe Homologien zur 16S rRNA von *E. coli* auf. Dies konnte durch Erstellen eines Sekundärstrukturmodelles der mitochondrialen 15S rRNA des Stammes 777-3A und Vergleich mit der Sekundärstruktur der 16S rRNA von *E. coli* (Moazed et al., 1986) gezeigt werden.

Ein Vergleich mit weiteren ribosomalen RNAs macht deutlich, daß die mitochondriale 15S rRNA stärker der 16S rRNA von *E. coli* ähnelt als den cytoplasmatischen kleinen rRNAs (18S rRNA). Dies ist ein zusätzlicher Hinweis auf den eubakteriellen Ursprung von Mitochondrien.

Während die Primärsequenz der mitochondrialen und bakteriellen kleinen ribosomalen RNAs zu etwa 44% Homologien aufweist (Sor und Fukuhara, 1982a), sind beide rRNAs zu ca. 80% auf Sekundärstrukturebene konserviert. Dies spricht für eine funktionale Bedeutung der jeweiligen Sekundärstrukturen. Somit ist es durchaus legitim - wie in Kapitel I geschehen - die Funktion der hochkonservierten "C-1400 Region" als Dekodierungszentrum dem C-1479 Bereich der mitochondrialen 15S rRNA zuzuordnen (vgl. Kapitel I und Abb.24). Auf Unterschiede in nicht konservierten Regionen beider rRNAs wird zu einem späteren Zeitpunkt ausführlich eingegangen.

Eine neue Cluster-Spezies in Mitochondrien

Neben der Sekundärstrukturanalyse der 16S rRNA von *E. coli* und der mitochondrialen 15S rRNA wurde auch ein Vergleich der Primärsequenzen von vier verschiedenen *S. cerevisiae* Stämmen durchgeführt (777-3A und KL14-4A : diese Arbeit; MH41-7B : Sor und Fukuhara, 1982a; D273-10B/A21 : Li et al., 1982).

Dabei wurde eine neue Spezies von optionalen Cluster-Insertionen in Mitochondrien entdeckt. Bis zu diesem Zeitpunkt waren in die-

sem Organell nur optionale GC-Cluster (Sequenzen mit einem GC-Gehalt >60%) bekannt, die als transposable Sequenzelemente angesehen werden, welche an bestimmte "Targetsites" des mitochondrialen Genomes integrieren (de Zamaroczy und Bernardi, 1986a; G. Weiller, 1987).

Durch Vergleich der 15S rRNA Gene der *S. cerevisiae*-Stämme konnten erstmals zwei optionale AT-Cluster (ATCL1 und ATCL2) identifiziert werden. Beide Cluster-Insertionen bestehen im Gegensatz zu GC-Clustern ausschließlich aus A- und T-Basen und weisen jeweils eine Länge von 16bp auf. Während dabei die Stämme KL14-4A und 777-3A (diese Arbeit) ATCL1 innerhalb ihres 15S rRNA Genes enthalten, trägt der Stamm D273-10B/A21 das AT-Cluster ATCL2 an entsprechender Stelle. Der Stamm MH41-7B (Sor und Fukuhara, 1982a) weist an der Insertionsstelle weder ATCL1 noch ATCL2 auf.

Es können nun zwei Modelle diskutiert werden, auf welche Weise AT-Cluster innerhalb der mitochondrialen 15S rRNA Gene der verschiedenen Stämme entstanden sein könnten.

1. Fehlerhafte Replikation : "slipped replication"

Es ist denkbar, daß bestimmte Sequenzbereiche durch die mitochondriale DNA-Polymerase bei der Replikation des mitochondrialen Genomes zweimal hintereinander repliziert werden. Dies könnte dadurch geschehen, daß die DNA-Polymerase nach Replikation eines bestimmten DNA-Abschnittes auf der DNA-Matrize "zurückgleitet" und diesen Bereich nochmals repliziert, was zu einer Duplikation der betreffenden Region führt. Ein solcher "slipped-replication-Mechanismus" wurde auch von Bernardi (1982) bei der Entstehung von AT-Spacer-Bereichen während der Evolution des mitochondrialen Genomes diskutiert.

Durch diesen Mechanismus könnte ATCL1 - gefunden in den Stämmen 777-3A und KL14-4A - dadurch erzeugt werden, daß die 5'-seitige, vor der ATCL1 Insertionsstelle gelegene Sequenz dupliziert wird. Wie bereits gezeigt, sind die 13 Basen dieser Sequenz mit den Basen 4-16 des ATCL1 identisch (vgl. Abb.23). Andererseits würde ein solcher Mechanismus voraussetzen, daß die Basen 1-3

des Clusters (AAT) zwischen diesen "direct repeats" de novo synthetisiert werden.

Zudem würde auch dieses Modell nicht die Entstehung der übrigen AT-Cluster (ATCL2, 3 und 4) erklären, da 5'-seitig vor diesen Insertionen keine "direct repeat" Sequenzbereiche beobachtet werden können.

2. Transpositionsmodell

Es deuten einige Befunde darauf hin, daß sich ATCLs - entsprechend GC-Clustern - als transposable Elemente verhalten. Zum einen können 14 der 16 Basen von ATCL1, bzw. ATCL2 - auf Grund von 7bp langen Palindromsequenzen - eine sogenannte "Hairpin-Struktur" ausbilden. Diese entspricht der "Hairpin-Struktur" von GC-Clustern (Abb.27).

Entsprechende palindrome Randsequenzen findet man an den Enden der AT-Cluster ATCL3 und ATCL4. Diese Sequenzelemente können auch bei anderen mobilen Elementen beobachtet werden. Dadurch sind die Ränder eines solchen Elementes in der Lage, miteinander in Paarung zu treten, während die dazwischenliegenden Sequenzen so eine haarnadelförmige Schleife bilden ("Hairpin-Struktur"). Durch diesen Vorgang werden die Ränder eines transposablen Elementes mit der Insertionsstelle der Wirts-DNA in räumliche Nähe gebracht. Diese Annäherung der Sequenzen bildet eine Voraussetzung zur sequenzspezifischen Rekombination (G. Weiller, 1987).

Eine "Hairpin-Struktur" wird auch beim optionalen GC-Cluster (GCCL1) beobachtet, welches in den Stämmen MH41-7B und D273-10B/A21 auftritt. In Abb.27 ist die Insertionsstelle dieses Clusters innerhalb der 15S rRNA Sekundärstruktur gezeigt. Vergleicht man Stämme, welche dieses optionale GC-Cluster tragen, mit Stämmen, welche dieses Cluster nicht enthalten (die Stämme 777-3A, bzw. KL14-4A), so fällt auf, daß eine T-Base deletiert ist; statt dessen wird die Cluster-Sequenz (73%GC-Gehalt) von 38bp Länge inseriert.

Betrachtet man die GC- und AT-Cluster-Insertionsstellen, so fällt auf, daß diese in Bereichen der 15S rRNA Sekundärstruktur lokali-

siert sind, welche unter allen bekannten kleinen rRNAs als schwach konserviert bekannt sind (Huysmans und De Wachter, 1986). Daraus läßt sich schließen, daß diesen Regionen wohl keine entscheidende funktionale Bedeutung innerhalb des 15S rRNA Moleküles zukommt, und GC- bzw. AT-Cluster Insertionen deshalb wohl toleriert werden können.

Für die Vorstellung, daß es sich bei ATCL1 und ATCL2 um transponierbare Elemente handelt, spricht weiterhin, daß beide Cluster in den entsprechenden Stämmen an identischen Positionen inseriert sind, während der Stamm MH41-7B an dieser Stelle keine derartigen Insertionen aufweist. Obwohl ATCL1 die "Spiegelkopie" von ATCL2 darstellt, kann dabei wegen gleicher 5'-3' Orientierung weder ATCL1 in ATCL2 umgewandelt werden noch umgekehrt, da denkbare Mechanismen wie Rekombinations- oder Replikationsvorgänge die strikte Einhaltung der 5'-3' Polarität verlangen. Es bleibt daher unklar, auf welche Weise es zur Insertion zweier verwandter Cluster kommen konnte, welche zwar von ihrer Basenabfolge her die "komplementäre" Sequenz zueinander besitzen, welche aber wegen gleicher 5'-3' Orientierung nicht als tatsächlich komplementär bezeichnet werden können.

Zusammenfassend gibt es einige Hinweise dafür, daß sich ATCLs entsprechend GC-Clustern als mitochondriale transposable Elemente verhalten, die an bestimmte Stellen des mitochondrialen Genomes (15S rRNA) integrieren können.

ATCLs in anderen Regionen des mitochondrialen Genomes

Es wurde die Möglichkeit untersucht, ob ATCLs als mobile Elemente auch in anderen Bereichen des mitochondrialen Genomes außerhalb des 15S rRNA Genes integrieren könnten. Dies wurde mit Hilfe des UWGCG-Find-Programmes durchgeführt (UWGCG : University of Wisconsin Genetics Computer Group). Dabei sind etwa 92% der Sequenzen des mitochondrialen Genomes bekannt und ca. die Hälfte davon - als AT-Spacer bezeichnet - haben einen GC-Gehalt kleiner als 5% (de Zamaroczy und Bernardi, 1986b; de Zamaroczy und Bernardi, 1987).

Auf dem mitochondrialen Genom konnten jedoch keine identi-

schen Kopien von ATCL1, 2, 3 oder 4 gefunden werden. Neun ATCL1- und sieben ATCL2-homologe Sequenzen, welche jeweils einen "mismatch" zu ATCL1, bzw. ATCL2 aufwiesen, wurden identifiziert. Jedoch spiegelt dies lediglich die statistische Wahrscheinlichkeit des Vorhandenseins einer 16bp langen Sequenz, welche nur aus A- und T-Basen besteht, in einer 30kb langen AT-Spacer-Region wieder.

Die geringe Häufigkeit des Auftretens von ATCL1 und ATCL2 im mitochondrialen Genom könnte damit zusammenhängen, daß diese Insertionen in nicht kodierenden Regionen (AT-Spacer-Regionen) keinem Selektionsdruck auf Beibehaltung ihrer Basensequenz unterliegen und somit leicht Mutationen ausgesetzt sind, ohne daß sich dies für die Hefezelle negativ auswirkt. Innerhalb des 15S rRNA Genes ist dies weniger wahrscheinlich, da durch Veränderung dieser Cluster funktionale Bereiche des Genes betroffen sein könnten.

Wenn das so ist, sollte man annehmen, daß ATCLs nur innerhalb eines frühen Stadiums des Evolutionsprozesses eine mobile Aktivität zeigten. Dieses "mobile" Stadium ist vermutlich mit der Periode identisch, als sich AT-Spacer Sequenzen und GC-Cluster von jeweils einer "Ursprungssequenz" ausgehend auf dem mitochondrialen Genom ausgebreitet haben (Bernardi, 1982).

ATCL3a und 3b, welche aus AAT- bzw. AT-repeats bestehen, treten viel häufiger als die anderen ATCLs auf. Wie von de Zamaroczy und Bernardi (1987) in ihren ausführlichen Untersuchungen über AT-Spacer-Sequenzen gezeigt werden konnte, tauchen einige Trinukleotide (ATA, TAT, TAA, AAT, TTA und ATT) öfter im mitochondrialen Genom auf, als statistisch zu erwarten wäre. Dies trifft auch auf bestimmte Hexanukleotide zu (AATAAT, ATTATT, TAATAA), welche die identischen "repeat-Motive" zu ATCL3a darstellen.

Interessanterweise werden diese "repeat-Sequenzen" nicht in unmittelbarer Nachbarschaft mit ihren komplementären Sequenzen gefunden, sondern sind wie ATCL3a und 3b in einiger Entfernung (50-100bp) zueinander lokalisiert.

Mögliche Funktion von ATCLs

ATCLs als "hot spots" von Rekombinationsereignissen

Auf der Basis früherer Daten kann vermutet werden, daß ATCLs bestimmte Funktionen innerhalb der Organisation des mitochondrialen Genomes ausüben, bzw. ausgeübt haben. Dabei ist denkbar, daß solche Sequenzen in ihrer Eigenschaft als transposable Elemente bevorzugte Stellen ("hot spots") von Rekombinationsereignissen sind (G. Weiller, 1987), welche innerhalb des mitochondrialen Genomes oder zwischen zwei unterschiedlichen mitochondrialen Genomen stattfinden können. Mitochondriale Genome weisen nämlich außerordentlich hohe Rekombinationsfrequenzen auf. Die Entstehung eines rho⁻-Deletionsgenomes stellt dabei einen Spezialfall der Rekombination dar, die Rekombination eines Genomes mit sich selbst.

In Abb.28 ist die Entstehung eines rho⁻-Genomes schematisch dargestellt (de Zamaroczy et al., 1983). Der Mechanismus der Exzision eines Genomabschnittes, der nach seiner Exzision, oftmals wiederholt, als ringförmiges Genom vorliegt, ist bis heute nicht vollständig geklärt. Auffällig bei der Analyse der Exzisionssequenzen war das Auftreten kurzer "direct repeats" an den Exzisionsenden, sodaß homologe Rekombination an diesen Enden als Exzisionsmechanismus diskutiert wird (de Zamaroczy et al., 1983). Da ATCL-Sequenzen in ihrer Eigenschaft als transposable Elemente "hot spots" von Rekombinationsereignissen darstellen könnten, sollte in diesem Zusammenhang überprüft werden, ob ATCL-homologe Sequenzen auch bei Rekombinationsereignissen während der rho⁻-Entstehung beteiligt sind.

Aus diesem Grund wurden die "repeat units" (d.h. die aus dem rho⁺-Genom exzisierten Genomabschnitte) von vier in Kapitel I beschriebenen rho⁻-Stämmen der 15S rRNA-Region vollständig sequenziert, um deren Exzisionssequenzen zu bestimmen. In Abb.29 sind die DNA-Sequenzen dieser Exzisionsstellen in den vier untersuchten rho⁻-Genomen dargestellt.

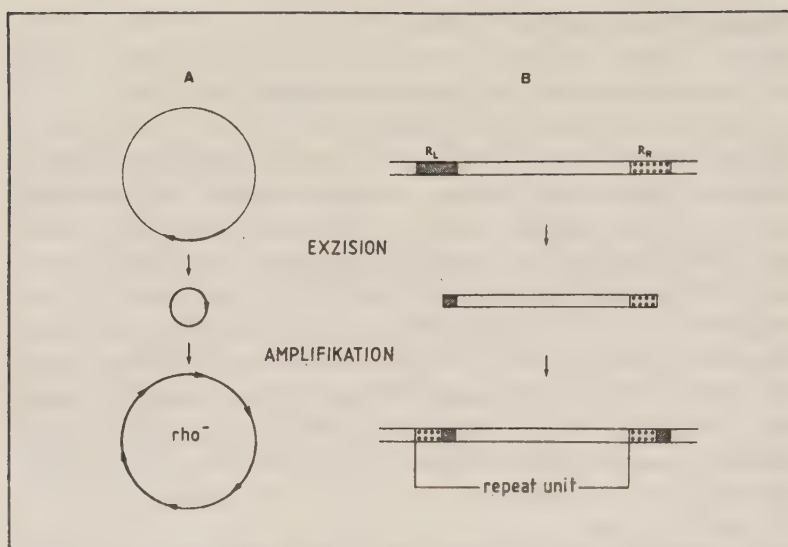


Abb.28 : Schematische Darstellung der Entstehung eines rho⁻-Genomes

A) Exzisions- und Amplifikationsprozess, der zur Bildung eines rho⁻-Genomes führt; dabei wird aus dem mitochondrialen Genom ein DNA-Segment exziiert (die sog. "repeat unit") und anschließend amplifiziert, was zu einem atemungsdefekten rho⁻-Genom führt.

B) "Direct repeats" (R_L und R_R), welche an den Enden der repeat unit lokalisiert sind; zwischen diesen Sequenzen findet das Rekombinationsereignis statt, welches schließlich zur Exzision der repeat unit führt; da die "direct repeats" vollkommen homologe Sequenzen darstellen, kann die exakte Exzisionsstelle nicht bestimmt werden.

Wie gezeigt, finden sich tatsächlich ATCL-homologe Sequenzen an den Exzisionsstellen. Allen Exzisionssequenzen gemeinsam ist das Auftreten der Hexanukleotidsequenzen AATTTT bzw. TTAAAA an den Exzisionsenden, die Bestandteil von ATCL1, bzw. ATCL2 sind (5'..TTAATATATAATTTT..3' bzw. 5'..AATTATATATTTAAA..3') Im rho⁻-Stamm KV8 ist die ATCL1 homologe Sequenz Bestandteil der kurzen "direct repeats" an beider Exzisionsenden.

Beim rho⁻-Stamm KV9 treten keine "direct repeats" (wie von de Zamorozcy et al. gefordert) als Exzisionssequenzen auf. Es werden nur partielle Homologien zwischen den Exzisionsenden gefunden.

KV8

GAGTAATTTTATTAGGAATTAATGAAC —
 —AATAATAATATTAATTTTATTATTA

KV9

AGTGAGGAATATTGGACAATGA —
 —TATATTTTAATAGTCCTGACTAATAT

KV13

AATAAAAATTATATAAAATA —
 —TAATAAAATATATAATATAAAATTATACT

KV6

AATTATATATAATTTTATATTATTTATTAATATA —
 —TATTATCTTATTATTTATATAATA

Abb.29 : rho⁻-Exzisionssequenzen

Exzisionssequenzen von vier rho⁻-Genomen aus dem 15S rRNA Bereich des Hefestammes KL14-4A. ATCLs und dazu homologe Sequenzen sind umrandet. Die linken (unten) und rechten (oben) Sequenzen (RL bzw. RR, vgl. Abb.28), welche die Exzisionsenden bilden, sind dargestellt; die Sequenzen sind in 5'-3' Orientierung geschrieben. Die Exzisionsstellen sind jeweils unterstrichen; wegen der vollkommenen Homologie zwischen den "direct repeats" in den rho⁻-Stämmen KV8, KV6 und KV13 kann die Exzisionsstelle nicht exakt bestimmt werden; partielle Sequenzhomologien sind gepunktet angezeigt; die Exzisionssequenz des rho⁻-Genomes KV9 lautet : 5'.AGTAGTG.3', die Übergangsstelle ist durch einen Schrägstrich angedeutet.

Die ATCL2 homologe Sequenz befindet sich in unmittelbarer Nähe eines der Exzisionsenden. Im rho-Stamm KV13 ist die zum ATCL1 homologe Sequenz wiederum Bestandteil der kurzen "direct repeat"-Sequenzen an den Exzisionsenden. Besonders bemerkenswert sind die Exzisionssites des rho-Stammes KV6. An einer der beiden Exzisionsstellen erfolgt die Exzision des rho-Genomes direkt am ATCL1 (Abb.29); d.h. das ATCL1 selbst, und nicht etwa eine dazu homologe Sequenz wirkt an der Exzision des rho-Genomabschnittes im rho-Stamm KV6 mit.

Die Befunde deuten darauf hin, daß ATCLs und dazu homologe Sequenzen an Exzisions- und Rekombinationsereignissen mitochondrialer Genome unmittelbar beteiligt sein können. Es kann aber, da experimentelle Daten dafür bis jetzt fehlen, nur darüber spekuliert werden, ob ATCLs und dazu homologe Sequenzen etwa spezifische Erkennungsstellen für mitochondriale Rekombinationsenzyme darstellen und somit die Schnittstellen für rho-Genomabschnitte determinieren. Um dieses Modell zu belegen, sind weitere in vivo und in vitro Experimente nötig.

ATCLs als Replikationsorigins

Andererseits weisen ATCL Sequenzen auch hohe Homologien zu Replikationsorigins auf. Auf dem mitochondrialen Genom sind sieben dieser kanonischen Replikationsorigins zu finden, welche aus jeweils drei GC-reichen Regionen bestehen, die von zwei AT-reichen Sequenzen unterbrochen werden.

Jedoch wurde auch von rho-Genomen berichtet, die in der Lage sind, sich zu replizieren und dabei ausschließlich aus AT-Basen bestehen (Fangman und Dujon, 1984). Daher muß die essentielle Funktion des Replikationsorigins von den AT-Sequenzen selbst übernommen werden. Wie von Pritchard und Cummins (1981) gezeigt werden konnte, besteht der "Origin of Replication" im mitochondrialen Genom von *Paramecium aurelia* aus einer Baseabfolge, welche außerordentlich große Homologie zu ATCL2 aufweist (5'...TTAATAAATTAAAA...3'). Es ist daher denkbar, daß ATCLs in rho-Genomen in analoger Weise die Funktion von Replikationsorigins übernehmen können.

Funktion von ATCLs in der Evolution des mitochondrialen Genomes

Schließlich kann vermutet werden, daß ATCLs und dazu homologe Sequenzen eine wichtige Rolle bei der Evolution des mitochondrialen Genomes spielten. Während des mitochondrialen endosymbiontischen Prozesses nämlich mußte das mitochondriale Genom neu organisiert werden, um ein bestimmtes "Set" an Genen, d.h. tRNA-Gene, rRNA-Gene und Gene für Proteine der Elektronentransportkette zurückzubehalten.

ATCLs und dazu homologe Sequenzen könnten auf Grund ihrer Rolle in Rekombinations- und Transpositionseignissen diesen Prozeß beschleunigt haben.

Kapitel III :

ISOLIERUNG UND ANALYSE VON SUPPRESSORMUTATIONEN, WELCHE DIE SPONTANE RASTERSCHUBSUPPRESSION DER RASTERSCHUB- MUTANTE M5631 VERSTÄRKEN

Einführung

In Kapitel I konnte gezeigt werden, daß die *par^r-454* Mutation innerhalb der mitochondrialen 15S rRNA eine Zunahme der Translationsgenauigkeit in Mitochondrien der Hefe *S. cerevisiae* bedingt. Wurde nämlich diese Mutation in das 15S rRNA Gen der Rasterschubmutante M5631 eingekreuzt (siehe Kapitel I), so führte dies, auf Grund einer erhöhten Translationsgenauigkeit, zur Abnahme der natürlichen Rasterschubsuppression dieses Stammes. Phänotypisch zeigte sich dieser Effekt an der Reduzierung des leaky Wachstums der Rasterschubmutante M5631 auf nicht vergärbaren Medien. Die Reduzierung des Wachstums war dabei darauf zurückzuführen, daß durch die Verringerung der natürlichen Rasterschubsuppression weniger Untereinheit II der Cytochrom-c-Oxidase in der Rasterschubmutante M5631 gebildet werden konnte (das für dieses Protein kodierende Gen trägt die +1 bp Rasterschubmutation des Stammes M5631).

In diesem Teil der Arbeit sollte nun untersucht werden, welche anderen Faktoren neben der *par^r-454* Mutation die mitochondriale Translationsgenauigkeit in Mitochondrien der Hefe *S. cerevisiae* beeinflussen. Dabei wurde als Ausgangsstamm die Rasterschubmutante M5631 verwendet, welche die *par^r-454* Mutation in ihrem 15S rRNA Gen enthielt. In diesem Stamm sollten nun solche Suppressormutationen isoliert werden, welche in der Lage waren, die durch die *par^r-454* Mutation gesteigerte mitochondriale Translationsgenauigkeit wieder zu reduzieren, d.h. mit anderen Worten die Translationsungenauigkeit zu erhöhen. Dies kann phänotypisch sehr leicht überprüft werden. Denn eine erhöhte Translationsungenauigkeit ist in diesem System mit erhöhter Rasterschubsuppression verbunden, da durch eine weniger genaue Translation die Einhaltung des Tripletteserahmens während der Translation vermindert wird.

Dies führt über eine vermehrte Bildung der Untereinheit II der Cytochrom-c-Oxidase (siehe oben) zur Wachstumssteigerung des betreffenden Suppressorstammes.

Auf diese Weise sollten Mutationen in weiteren Faktoren des Translationsapparates gefunden werden, welche an der Einhaltung der Translationsgenauigkeit während der mitochondrialen Proteinbiosynthese beteiligt sind.

Ergebnisse

1. Der reduziert leaky wachsende Stamm HS2-5631

Wie in Kapitel I beschrieben, wurde die $\text{par}^{\text{r}}\text{-454}$ Mutation in das 15S rRNA Gen des leaky wachsenden Originalstammes M5631 eingekreuzt. Dies führte, auf Grund reduzierter Rasterschubsuppression, zur Reduzierung des leaky Wachstums des Stammes auf nicht vergärbaren Medien.

Für Kreuzungsanalysen mußte der diploide Stamm sporuliert werden, um zu einem Stamm mit haploiden Kerngenom zu gelangen. (Kreuzungsanalysen sind nur zwischen haploiden Stämmen mit unterschiedlichen Paarungstypen möglich). Dieser haploide Stamm, im weiteren als HS2-5631 bezeichnet, wurde von H. Sakai zur Verfügung gestellt (Tab.1). Um zu überprüfen, ob die $\text{par}^{\text{r}}\text{-454}$ Mutation tatsächlich im 15S rRNA Gen dieses Stammes vorhanden war, wurde der betreffende Bereich im Stamm HS2-5631 sequenziert (zur Sequenzierungsstrategie siehe Kapitel II). Nach Bestätigung des Vorhandenseins der $\text{par}^{\text{r}}\text{-454}$ Mutation im Stamm HS2-5631 wurden nun von diesem Stamm spontane Suppressormutanten isoliert.

2. Isolierung von Rasterschubsuppressoren im Stamm HS2-5631

Der Stamm HS2-5631 kann auf nicht vergärbaren Medien (z.B. Glycerin) bei 23° und 30°C nicht wachsen und nur äußerst schwach bei 36°C; dies wird als "reduziertes leaky Wachstum" bezeichnet. Vom Phänotyp des Ausgangsstammes M5631 unterscheidet sich dieser Stamm nur durch das Vorhandensein der $\text{par}^{\text{r}}\text{-454}$ Mutation innerhalb der mitochondrialen 15S rRNA (zu Phänotypen siehe Abb.30). Diese Mutation bewirkt im betreffenden Stamm HS2-5631 die Reduzierung des leaky Wachstums (vgl. Kapitel I).

Im Stamm HS2-5631 wurden nun Suppressormutanten isoliert, deren Mutationen dieser Reduzierung des Wachstums entgegenwirken konnten. Dabei wurden 2×10^8 Zellen des Stammes HS2-5631 auf Glycerin, einem nicht vergärbaren Medium, ausplattiert und bei

30°C bebrütet. Während der Zellrasen nicht wachsen konnte (der Stamm HS2-5631 ist bei 30°C atmungsdefekt), erschienen nach 6-8 Tagen Bebrütung leaky wachsende Zellen. Zehn Suppressorstämme dieses Phänotypes wurden so von dem reduziert leaky wachsenden Stamm HS2-5631 isoliert.

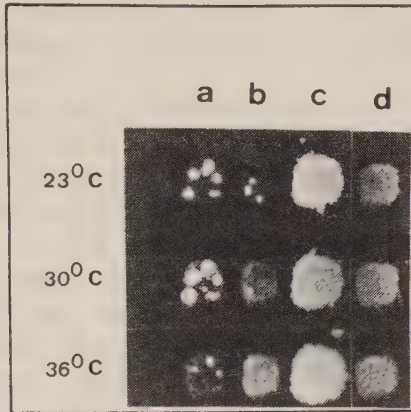


Abb.30 : Phänotyp des reduziert leaky wachsenden Ausgangsstammes HS2-5631 (a), der Mutante M5631 (b), des zugehörigen Wildtypstammes 777-3A (c) sowie des leaky wachsenden Suppressorstammes SEG15 (d) auf nicht vergärbarem Medium bei drei Temperaturen (23°, 30° und 36°C)

Die jeweiligen Kolonien wurden in einer Mikrotiterplatte mit YD-Medium bis zur stationären Phase hochgezogen und anschließend auf drei YG-Platten überstempelt, welche bei 23°, 30° bzw. 36°C für 8 Tage inkubiert wurden (da die Mutante M5631 sowie der ihr zugehörige Wildtypstamm 777-3A die rezessive *opl* Kernmutation tragen, welche auf nicht vergärbaren Medien Atmungsdefizienz verursacht, mußten diese Stämme zuvor mit einem *rho*⁰-Stamm gekreuzt werden, welcher das Wildtypallel zu dieser Kernmutation trägt); Pusteln innerhalb der Kolonien a und b stellen Revertanten der Rasterschubmutation M5631 dar (M5631→WT).

Einer dieser Suppressorstämme zeigte ein geringfügig stärkeres leaky Wachstum als die Originalmutante M5631 (Phänotyp : siehe Abb.30d). Deshalb lag die Vermutung nahe, daß in diesem Stamm nicht eine einfache Reversion der *par*^r-454 Mutation vorlag, sondern eine, in einem anderen Bereich des mitochondrialen Genomes gelegene Suppressormutation die Verstärkung des Wachstums be-

wirkte. Dieser Stamm, im weiteren als Suppressorstamm SEG15 bezeichnet, wurde daher mit genetischen und biochemischen Methoden genauer analysiert.

3. Genetische Analyse des Suppressorstammes SEG15

3.1 Mitochondriale Lokalisation der Suppressormutation

Um die Suppressormutation im Stamm SEG15 im mitochondrialen oder nukleären Genom zu lokalisieren, wurden genetische Kreuzungen nach Dujardin et al. (1980) durchgeführt.

Dabei wurde vom Suppressorstamm SEG15 der rho^+ -Stamm (mit vollständigem mitochondrialen Genom) und der entsprechende rho^0 -Stamm (ohne mitochondriales Genom) mit einem Stamm gekreuzt, welcher das mitochondriale Genom der Ausgangsmutante HS2-5631 enthielt. Dieser Stamm, im weiteren als MS20[HS2-5631] bezeichnet, wurde durch kar-Kreuzung aus den Stämmen HS2-5631 [rho^+] und MS20 [rho^0] erhalten (siehe Material und Methoden).

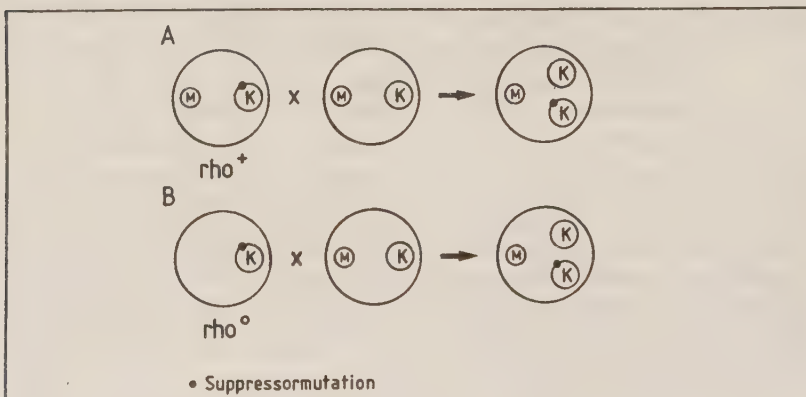


Abb.31 : Kernkodierte Suppressormutation

Schema der rho^+ - (A) und der rho^0 - (B) Kreuzung des Suppressorstammes SEG15 mit einem Stamm, welcher dem mitochondrialen Genom der Ausgangsmutante HS2-5631 besitzt, für den Fall einer kernkodierten Suppressormutation; M = Mitochondriales Genom; K = Kerngenom.

Ist die Suppressormutation kernkodiert und gleichzeitig dominant, so kommt sie sowohl bei Kreuzung des rho^+ - als auch des rho^0 -Stammes zur phänotypischen Ausprägung : alle Nachkommen aus der Kreuzung tragen die Suppressormutation im Kern (Abb.31). Ist die Suppressormutation jedoch mitochondrial kodiert, so enthalten nur Nachkommen aus der rho^+ - nicht aber aus der rho^0 -Kreuzung die Suppressormutation (Abb.32). Da diese Mutation eine Wachstumssteigerung des Ausgangsstammes MS20-HS2-5631 auf nicht vergärbaren Medien bewirkt, kann dies leicht überprüft werden.

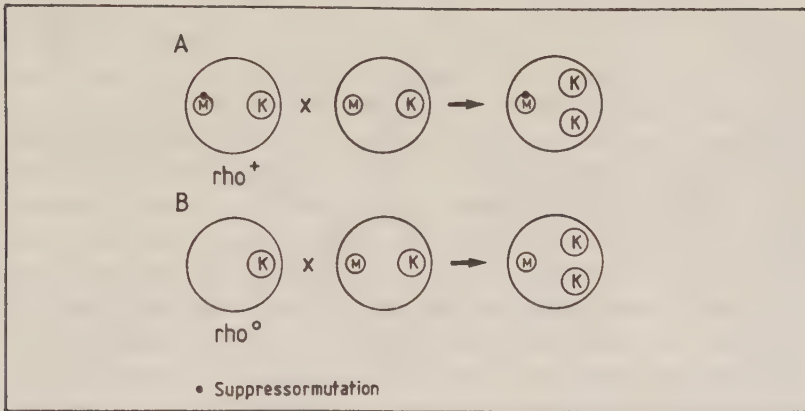


Abb.32 : Mitochondrial kodierte Suppressormutation

Schema der rho^+ - (A) und rho^0 - (B) Kreuzung des Suppressorstammes SEG15 mit einem Stamm, welcher das mitochondriale Genom des Ausgangsstammes HS2-5631 besitzt, für den Fall einer mitochondrial kodierten Suppressormutation; in der rho^+ - Kreuzung (A) ist nur der Nachkomme gezeigt, welcher die Suppressormutation trägt; in dieser Kreuzung treten - nach erfolgter Segregation - auch Nachkommen auf, welche das mitochondriale Genom des Ausgangsstammes ohne Suppressormutation enthalten. M = Mitochondriales Genom; K = Kerngenom.

Für die Suppressormutante SEG15 trifft der zuletzt genannte Fall zu. Kreuzungen ihres rho^+ -Stammes mit der Ausgangsmutante MS20[HS2-5631] ergaben leaky und reduziert leaky wachsende Zellen. In der Kreuzung des rho^0 -Stammes der Suppressormutante mit dem Stamm MS20[HS2-5631] tauchten nur Kolonien mit reduziertem leaky Wachstum auf (zu den Kreuzungen siehe Tabelle 4). Dies bedeutet, daß nur in der Kreuzung des rho^+ -Stammes der

Suppressormutante SEG15 die Suppressormutation zur phänotypischen Ausprägung kommt, nicht jedoch in der Kreuzung des ρ^0 -Stammes der Mutante. Daraus kann geschlossen werden, daß die Suppressormutation auf dem ρ^+ -Genom, also mitochondrial kodiert ist.

3.2 Bestimmung des mitochondrialen Genbereiches, der die Suppressormutation des Stammes SEG15 trägt

Als nächstes sollte die Suppressormutation, im weiteren als mfs-1 bezeichnet (mitochondrial frameshift suppressor 1), einem bestimmten mitochondrialen Genbereich zugeordnet werden.

Dazu bietet sich die ρ^- -Deletionskartierung an, welche bereits ausführlich in Kapitel I bei der Lokalisierung der restriktiven Mutation innerhalb der 15S rRNA beschrieben wurde. Das grundlegende Prinzip dieser Methode stellt sich wie folgt dar : aus dem Suppressorstamm SEG15 werden verschiedene ρ^- -Stämme isoliert, welche unterschiedliche Bereiche des mitochondrialen SEG15-Genomes zurückbehalten haben (Abb.33A). Die erhaltenen ρ^- -Klone werden jeweils mit einem reduziert leaky wachsenden Stamm (MS20[HS2-5631]) gekreuzt, welcher das mitochondriale Genom des Ausgangsstammes HS2-5631 besitzt (Abb.33B).

Falls ein ρ^- -Stamm dasjenige Genomsegment zurückbehalten hat, welches die Suppressormutation trägt, so können nach der Kreuzung mit dem reduziert leaky wachsenden Stamm MS20[HS2-5631] Rekombinantent entstehen, welche leaky Wachstum zeigen (Abb.33C). In Tabelle 5 sind die Ergebnisse dieser Kreuzungen aufgeführt (für nähere Details siehe Legende).

In der Kreuzung des ρ^- -Stammes SEG15/S1 mit dem Ausgangsstamm MS20-HS2-5631 tauchten drei Typen von Kolonien auf : die Elternphänotypen (ρ^- : atmungsdefekt ; MS20[HS2-5631] : reduziert leaky) und rekombinante Zellen, die leaky Wachstum zeigten. Solche leaky wachsenden Zellen tauchten nicht bei Kreuzungen mit den ρ^- -Stämmen SEG15/S5 und SEG15/S6 sowie dem ρ^0 -Stamm SEG15/A1 auf. Entsprechende Ergebnisse wurden in einer Kontrollkreuzung erzielt, die in Tab.5B aufgeführt ist (siehe Legende). Zusammengefaßt zeigen die Daten, daß die Suppressormutation des

Kreuzungen	Phänotypen		Anzahl an getesteten Kolonien
	leaky	reduziert leaky	
SEG15[rho ⁺] x MS20[HS2-5631] [rho ⁺]	60%	40%	480
SEG15/A1[rho ^o] x MS20[HS2-5631] [rho ⁺]	-	100%	490

Tab.4 : Kreuzungen zur mitochondrialen Lokalisation der Suppressormutation im Stamm SEG15

Die Kreuzungen wurden durchgeführt, wie in Material und Methoden beschrieben; zu den Phänotypen bei drei Temperaturen auf nicht vergärbarem Medium (leaky, reduziert leaky) siehe Abb.30.

Kreuzungen	Phänotypen		Anzahl an getesteten Kolonien
	rho ⁻	reduziert leaky	
A		leaky	
	20%	45%	35%
	20%	80%	-
	25%	75%	-
	-	100%	-
B			
	28%	50%	22%
	-	100%	-

Tab.5 : rho⁻-Deletionskartierung zur Lokalisierung der mfs-1 Mutation

A) Kreuzungen verschiedener rho⁻-Klone, welche die mfs-1 Suppressormutation entweder zurückbehalten oder deletiert haben, mit dem Stamm MS20[HS2-5631].

B) Kontrollkreuzung des rho⁻-Stammes SEG15/S1; zu den Phänotypen (leaky, reduziert leaky) vgl. Abb.30.

Stammes SEG15 in jenem Genomsegment lokalisiert ist, welches im rho-Stamm SEG15/S1 zurückbehalten wird.

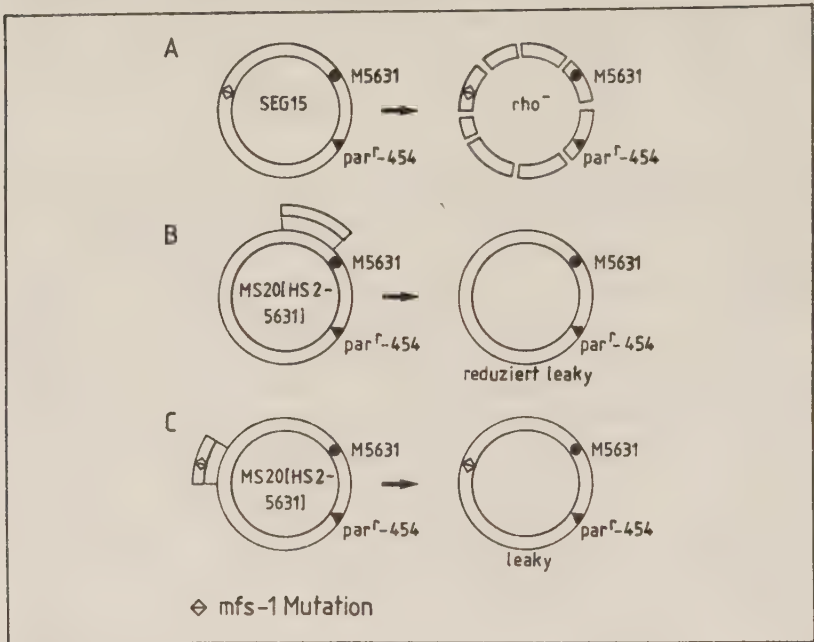


Abb.33 : Schema zur Identifizierung des mitochondrialen Genbereiches, welcher die mfs-1 Suppressormutation trägt

A) Isolierung von unterschiedlichen *rho*⁻-Deletionsstämmen aus dem Suppressorstamm SEG15; B) Kreuzung eines definierten *rho*⁻-Stammes aus dem Suppressorstamm SEG15, welcher die mfs-1 Mutation nicht enthält, mit dem Stamm MS20[HS2-5631]; C) Kreuzung eines *rho*⁻-Stammes aus dem Suppressorstamm SEG15, welcher die mfs-1 Mutation zurückbehalten hat, mit dem Stamm MS20[HS2-5631]. Der Phänotyp der rekombinanten Nachkommen auf einem nicht vergärbaren Medium (reduziert leaky, leaky) ist jeweils angezeigt.

4. Genetische Analyse des rho-Klones SEG15/S1

4.1 Kartierung des rho-Klones SEG15/S1 durch mit-Kreuzungen

Um zu bestimmen, welcher Sequenzanteil im mitochondrialen Genom des Klones SEG15/S1 zurückbehalten worden war, wurden Kreuzungen mit verschiedenen mit-Testerstämmen durchgeführt. Die Mutationen der Testerstämmen waren bereits in der cob-, oxil-oxi2-, bzw. oxi3-Genregion des mitochondrialen Genoms kartiert (Tab.6). Alle diese mit-Mutationen zeigten einen atmungsdefekten Phänotyp auf nicht vergärbarem Medium, wie z.B. Glycerin.

SEG15/S1 x	Mutation des mit-Stammes	Wachstum auf Glycerin
777-3A-4901	COB-	-
777-3A-5821	OXI1-	-
777-3A-5491	OXI2-	-
777-3A-7374	OXI3-	-

Tab.6 : Kreuzung des rho-Stammes SEG15/S1 mit verschiedenen mitochondrialen Punktmutanten

Die Kreuzungen wurden durchgeführt, wie in Material und Methoden beschrieben; + bezeichnet Wachstum, - kein Wachstum der rekombinanten Nachkommen auf nicht vergärbarem Medium.

Das grundlegende Prinzip der mit-Kreuzung ist im Detail von Dujardin et al. (1980) beschrieben : Wenn das vom rho-Klon zurückbehaltene Genomsegment das Wildtypallel zur Mutation der entsprechenden mit-Mutante trägt, entstehen nach Rekombination dieses Genomabschnittes in den mit-Stamm atmungskompetente Nachkommen. Dies kann auf Glycerinmedium leicht getestet werden. Auf diese Weise ist es möglich, zu bestimmen, welcher mitochondriale Genomanteil im rho-Genom zurückbehalten wurde.

Keiner der mit-Testerstämmen konnte durch den rho-Klon SEG15/S1 zur Atmungskompetenz restauriert werden. Dies bedeutet, daß dessen mitochondriales Genom nicht in der cob-, oxil-, oxi2-, bzw. oxi3-Region lokalisiert ist. Das mitochondriale Genom des

Stammes SEG15/S1 konnte also durch genetische Analysen nicht weiter kartiert werden. Demzufolge wurde eine molekulare Analyse seines Genomes durchgeführt. Zuvor sollte jedoch die Wirkung der mfs-1 Suppressormutation auf andere Rasterschub-, Missense- oder Nonsensemutationen getestet werden.

4.2 Wirkung der Suppressormutation mfs-1 auf andere Rasterschub-, Missense- oder Ochre-Mutationen

Der die Suppressormutation tragende rho-Stamm SEG15/S1 wurde mit zwölf verschiedenen mitochondrialen Rasterschub-, Missense- oder Ochre-Mutanten gekreuzt (siehe Tab.7). Die diploiden Zellen wurden auf ein Medium replica-plattiert, welches ein nicht vergärbares Substrat enthält.

In keiner der Kreuzungen des rho-Stammes SEG15/S1 mit den entsprechenden Mutanten konnte eine phänotypische Ausprägung der Suppressormutation beobachtet werden. Ein Suppressionseffekt der mfs-1 Mutation auf diese Mutationen ist somit auszuschließen. Dies trifft selbst auf die Rasterschubmutante M5701 zu, welche an derselben Position eine Rasterschubmutation trägt, wie die vom mfs-1 supprimierte Mutation M5631 (die Rasterschubmutante M5701 enthält an Stelle der Insertion einer T-Base - wie sie in der Mutante M5631 auftritt - die Deletion einer T-Base an gleicher Stelle).

Diese Ergebnisse zeigen, daß die Suppressormutation mfs-1 im Stamm SEG15 außerordentlich sequenzspezifisch wirkt. Da die mfs-1 Mutation mit genetischen Methoden nicht weiter eingegrenzt werden konnte, wurde nun eine molekulargenetische Analyse der Suppressormutation vorgenommen.

5. Molekulare Analyse der Suppressormutation mfs-1

5.1 Restriktionsanalyse des rho-Genomes im Stamm SEG15/S1

Aus dem Stamm SEG15/S1 wurde die mitochondriale DNA isoliert, mit den Restriktionsenzymen HpaII, bzw. HaeIII verdaut und die

Mutation	Art der Mutation	Gen	Suppression	Referenz
M4577	+1 (Rasterschub)	cob	-	Weiss-Brummer et al. (1984)
M4901	-1 (Rasterschub)	cob	-	Weiss-Brummer et al. (1984)
M631	-1 (Rasterschub)	cob	-	Weiss-Brummer et al. (1984)
M4931	+1 (Rasterschub)	cob	-	Weiss-Brummer et al. (1984)
M7711	TGT→TAT (Missense)	cob	-	Weiss-Brummer et al. (1984)
M6821	TAT→TAA (Ochre)	cob	-	Weiss-Brummer et al. (1984)
M4611	TTA→TAA (Ochre)	oxi1	-	Fox und Staempfli (1982)
M5611	CAA→TAA (Ochre)	oxi1	-	Fox und Staempfli (1982)
M5801	GGT→GTT (Missense)	oxi1	-	Fox und Staempfli (1982)
M2511	-1 (Rasterschub)	oxi1	-	Fox und Staempfli (1982)
M5701	-1 (Rasterschub)	oxi1	-	Fox und Weiss-Brummer (1980)

Tab.7 : mfs-1 Suppressoraktivität

Der rho⁻-Stamm SEG15/S1, welcher die mfs-1 Suppressormutation in seinem mitochondrialen Genom zurückbehalten hat, wurde mit einer Serie von Rasterschub-, Missense- bzw. Ochre-Mutanten gekreuzt; Suppression einer dieser Mutationen durch die mfs-1 Suppressormutation wurde mit (+), keine Suppression mit (-) angegeben.

erhaltenen Fragmente in einem 1.5%-igen Agarosegel aufgetrennt (siehe Material und Methoden).

In der HpaII-Restriktionsanalyse tauchten drei Banden von ca. 330bp, 680bp und 1000bp Länge auf (Abb.34). Bei der HaeIII-Restriktion ergab sich eine einzige Bande von ca. 2000bp Länge. Dies bedeutet, daß der mitochondriale Genomanteil, der im rho⁻-Stamm SEG15/S1 zurückbehalten wird (die sog. "repeat unit"), eine Länge von ca. 2000bp aufweist. Innerhalb dieses Bereiches sollte die Suppressormutation lokalisiert sein, welche in der Lage ist, die Rasterschubmutation M5631 im oxil-Gen des Ausgangsstammes HS2-5631 zu supprimieren.

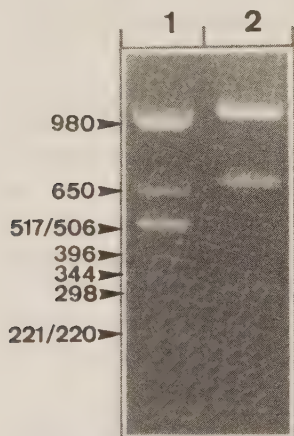


Abb.34 : HpaII-Restriktion des SEG15/S1 rho⁻-Genomes

Die Restriktionsfragmente wurden in einem 1.5%-igen Agarosegel aufgetrennt. Spur 1 : Längenmarker, pBR322-DNA mit HindIII und HinfI verdaut; Spur 2 : HpaII-Restriktion des SEG15/S1 rho⁻-Genomes.

5.2 Sequenzanalyse der mfs-1 Suppressormutation

Das 2000bp lange HaeIII-Fragment des rho⁻-Stammes SEG15/S1 (siehe oben) wurde in einen mit SmaI geschnittenen M13 Vektor (mp8), wie in Material und Methoden beschrieben, kloniert. Parallel

dazu wurde das entsprechende HaeIII-Fragment aus dem rho⁺-Genom des Ursprungsstammes HS2-5631 isoliert und, wie oben beschrieben, in den M13 Vektor mp8 kloniert.

Sowohl das 2000bp lange Fragment des Ursprungsstammes als das die mfs-1 Mutation tragenden Stammes SEG15/S1 wurden vollständig nach der Kettenabbruchmethode von Sanger (1977) sequenziert (siehe Material und Methoden). Dabei wurden synthetische Oligonukleotide als Primer für die Sequenzreaktionen verwendet. In Abb.35 ist die Sequenzierungsstrategie für das 2000bp-Fragment dargestellt.

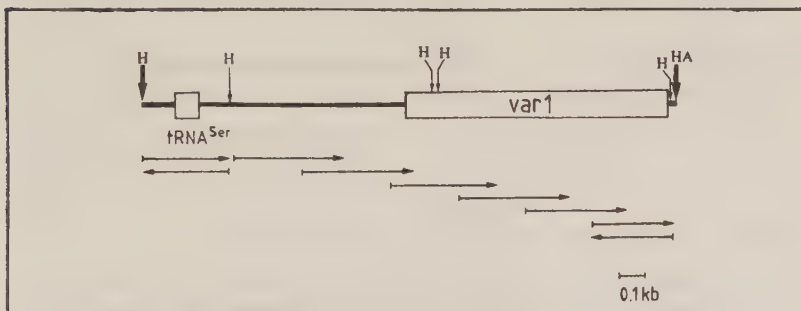


Abb.35 : Strategie zur Sequenzierung des SEG15/S1 rho⁻-Genomes

Richtung und Länge der durchgeführten Sequenzierungen sind durch Pfeile markiert; H=HpaII; HA=HaeIII.

Durch Vergleich mit bereits publizierten Sequenzen des mitochondrialen Genomes (Review, siehe de Zamaroczy und Bernardi, 1986b) konnte das 2000bp Fragment in der $var1$ - $tRNA^{Ser}$ -Region lokalisiert werden. Dieser Genombereich war von Hudspeth et al. (1982) bereits eingehend analysiert worden. Der 2000bp-Bereich, der im mitochondrialen Genom des rho⁻-Stammes SEG15 zurückbehalten wird, enthält die gesamten kodierenden Regionen für das $var1$ -Gen und für das $tRNA^{Ser}$ -Gen (Abb.36). Das $var1$ -Genprodukt wurde dabei von oben genannten Autoren als das einzige mito-ribosomale Protein identifiziert, welches mitochondrial kodiert ist.

Die Wildtyp-DNA-Sequenz der $tRNA^{Ser}$ war bereits von Miller et al. (1979) erstellt worden; eine tRNA-Sequenzierung der $tRNA^{Ser}$ wurde von Martin et al. (1982b) durchgeführt, außerdem wurden

von Martin et al. (1982b) die Basenmodifikationen innerhalb des tRNA^{Ser}-Moleküles bestimmt.

Der einzige Basenaustausch, der bei Vergleich der DNA-Sequenzen von Originalstamm HS2-5631 und Suppressorstamm SEG15 gefunden wurde, ist der Austausch C→T an Pos.42 innerhalb des tRNA^{Ser} Genes (Abb.37). In Abb.38 ist die DNA-Sequenz des gesamten var1-tRNA^{Ser}-Bereiches gezeigt. Der Basenaustausch C→T führt in der tRNA^{Ser} zur Umwandlung einer G-C Bindung in eine G•U Basenpaarung an Position 42 im Anticodon-Stamm der tRNA (siehe Abb.39).

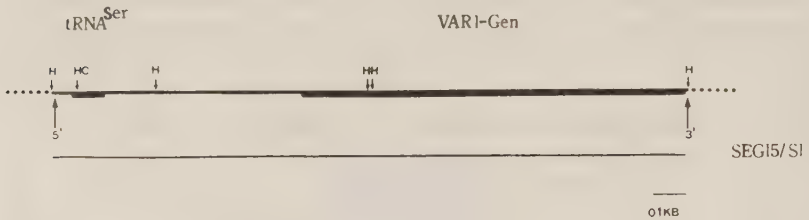


Abb.36 : Lokalisierung des SEG15 rho⁻-Genomes

Oben : Restriktionskarte der var1-tRNA^{Ser} Region; H=HpaII, HC=HincII.
Unten : "repeat unit", die im rho⁻-Stamm SEG15 zurückbehalten wird.

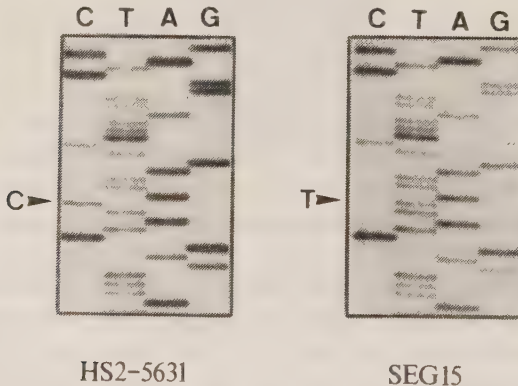


Abb.37 : mfs-1 Mutation

Ausschnitt der tRNA^{Ser} DNA-Sequenz zur Bestimmung der mfs-1 Mutation; links : Sequenz des Ausgangsstammes HS2-5631; rechts : Sequenz des Suppressorstammes SEG15. Der Basenaustausch C nach T ist angezeigt.

```

CCGGAACCCGAAAGGAGTTTATTTAATATTTATATTTATTAATATTTATATTTATATTTATATTTATTC 75
TCTTAAGGATGGTTGACTGAGTGGTTAAAGGTGATATTTGAGCTAUCATTAGTCTTTATGGCTACGTAGGT 150
CAAACTCCTACATCATCGGTAATAATACATATATAATAATAATTTTAATATTATTCCTATAAAAAATAAAATAA 225
TAAATAAATAATAATAATTAATTAATTAATTAATTTTAATAAATAATAAATAATAAAAAATAATAATAATAA 300
TTATTATTTTAATAATATTATTTATATAAATAGTCGGTCCGACCCCTTTTATCTTAAGAGGGATTTTTTTTTA 375
TTAATTAATAATAATATATTAAAAATTATAAATAATTAATAATTTCTTATATTATATATATATATATATTTA 450
TATATTTATATATATATTTTAATAATATTATGATATATTTTATTTAATAATATTATTTTATATATAATAAAT 525
TATAATATTTTATTTTATAAATTATTTATATAAAATTATTAATAATAATATTTTTTTTTTATTGGGATTATA 600
TTATTATTATAAAGAATATAATGTATTAACTGCAAAAAATATCTAAATATAATTATTTTATAATAATAAAT 675
AATATTATAATAAGGATGCATATTATATATATATATATTTCTATTATATTAATTAATTAATTAATATGTATA 750
TATAATAGATAAAAAAGTAAAAATAAAAAATAAGAAATAAAATTAAATATAATTTTCAATAATAAATAA 825
M K L K L L N M I L S M M N K
ACTTAATAATAATAATAATATTATTAATAATCTATTAGATTCATTAATAATAAGAAATTTATTTAAAGAA 900
T N N N N N N I I I N N N L L D S L M N K L L L K N
TATATTATAGATATAAATAATAAAAAATAAATAATAAAAAAGAAATTAAATAATAATAATAAACCCCGC 975
M L L D M N N K K M N N M K R M L N N N N M N P A
GGGGCCCAATCCGGTGTGTTACCGGATGGTCCCGGGGAATTAATAATAAATTAACAACATTTAAATAATAT 1050
G A N P V V H R I G P A G N I N N K L Q H L N N M
AAATAATGAAATCTACAAATTTATAAATTATAAATAAATAATAGAAATTATAAATACTATAAATGATAAATTAAT 1125
N N W N L Q I Y N Y N K N M E I M N T M N D K L I
TAATAAATTTATATATAAATAATAACTTTAAATTAATAATAATAATTAATAAATTTATTAAGTAAACT 1200
N K L L Y K M M T L K L N N M N I N K I I M S K T
TATTAAATCAACATAGTTTAAATAAATAAATAAATTTATTAATTAATAATGATATTAATAATAATAATAA 1275
I N Q H S L N K L N I K F Y Y Y N N D I N N N N N
TAATAATAATAATAATAATAATTTATATAAATAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA 1350
N N N N N N N Y Y M N M M N K L M N I M N N N M N
TAATAATTTATGAAATTTTAAGTTATTATTATAATAAAAAAGTAACTATTGGAACCTATTAAATATCATATAT 1425
N N L C N I L S Y Y Y N K K V T I E P I K L S Y I
TTATTAAATAGTGATATTTTATGATAATATATTAGTTTAAATGATAGATAAATAATAATGGTATCTTAC 1500
Y L N S D I F S K Y I S L N D M D K Y N N G I L T
TAATTATCAAGTATATTAATAATATTTATGCCTAAATTAATGATCATAATTTCTATAAATATATTAATAA 1575
N Y Q R M L N N I M P K L N D H N I S M N Y I N N
TATTAATAATATTAATAATAATAATAATAATAATAATAATTAATTTATTAATAATAATAATAATAATAATAA 1650
I N N I N N N K Y N N M I N L L N N N N N N N N
TAATAATATTAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAA 1725
N N I N N N N N N N N N N Y I G N I N N I Y N
TAATAATACTATTGATAATTTCCATAGATATTTTAATATAAATAATTTAGTTGGTGTGATCTATTAAATTTAA 1800
N M T I D N I P M D I L M Y K Y L V G W S I K F K
AGGTAGATTAAATAATAATGGTAGAACTAGTAGACTTAATTTATTAATAAATAATAATAATAATAATAATA 1875
G R L S N N N N G R T S T T N L L N G T F N N K K Y
TTTATGAAGTAATATTAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAA 1950
L W S N I N N N Y K L N Y I P S N H N L Y N N S N
TATTAATAAATAAGGTAAATATTAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAA 2025
I N K N G K Y N I K V K L N F I *

```

Abb.38 : DNA-Sequenz des var1-tRNA^{Ser}-Bereiches im Stamm HS2-5631

Der im Suppressorstamm SEG15 gefundene Basenaustausch C nach T ist umrahmt und durch einen Stern markiert; die tRNA^{Ser} Sequenz ist unterstrichen, für das var1-Gen ist zusätzlich die Aminosäuresequenz angegeben.

6. Eine tRNA^{Ser} Mutante als Suppressor der Rasterschubmutation M5631

Es stellte sich nun die Frage, auf welche Weise eine mutierte tRNA^{Ser} an der Suppression der Rasterschubmutation M5631 im oxil-Gen beteiligt sein könnte.

Die Wildtyp- wie auch die Suppressor-tRNA^{Ser} besitzen das Anticodon 5'..UGA..3' und sind somit in der Lage, die Codons UCA, UCG, UCU und UCC (= UCN) zu dekodieren (Martin et al., 1982b). Bei der Analyse des Rasterschubmutationsortes M5631 im oxil-Gen fällt auf, daß das erste Codon, welches im verschobenen Leserahmen vom Wildtypleserahmen abweicht, das Codon UCC ist (ein Codon für die Aminosäure Serin), das somit von der tRNA^{Ser}UCN gelesen werden kann (Abb.40). Wie diese mutierte tRNA^{Ser}UCN aber in der Lage sein sollte, am Mutationsort einen Rasterschub zurück in den Wildtypleserahmen zu induzieren und damit die M5631 Mutation zu supprimieren, war bis dahin völlig unklar.

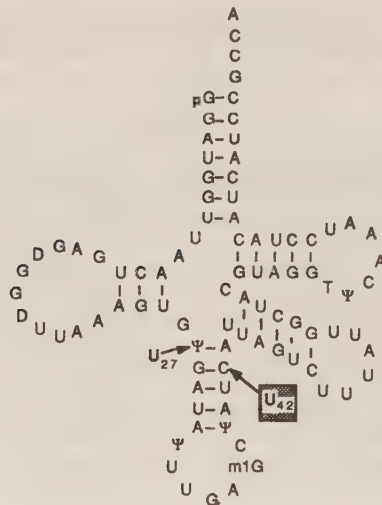


Abb.39 : Kleeblattstruktur der mitochondrialen tRNA^{Ser}UCN

Sekundärstruktur der tRNA^{Ser}UCN im Stamm HS2-5631; eingezeichnet ist die mfs-1 Suppressormutation C nach U an Pos.42 der tRNA im Suppressorstamm SEG15; zusätzlich ist die Modifikation eines Uridin zu Pseudouridin an Pos.27 der Wildtyp tRNA^{Ser}UCN im Stamm HS2-5631 angezeigt (siehe Text).

Um den Mechanismus der Rasterschubsuppression durch diese tRNA aufzuklären, sollte die mutierte tRNA^{Ser}UCN zunächst eingehend analysiert werden. Es war zu untersuchen, ob die Primärmutation C→U im Anticodon-Stamm der tRNA Auswirkungen auf deren Transkription, Prozessierung, Aminoacylierbarkeit oder Sekundärstruktur hatte. Diese Versuche wurden während eines Gastaufenthalts in Strasbourg/Frankreich am I.B.M.C. zusammen mit Dr. R. Martin durchgeführt.

Um die weiteren Experimente verständlicher zu machen, soll zunächst kurz dargelegt werden, was über Serin dekodierende tRNAs in Mitochondrien der Hefe *S. cerevisiae* bis zu diesem Zeitpunkt bekannt war.

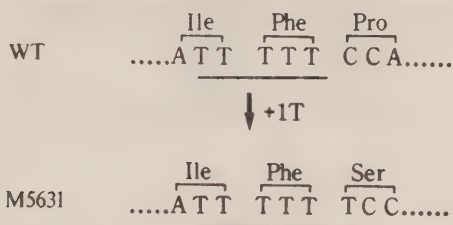


Abb.40 : M5631 Mutationsort

Mutationsort der M5631 Mutation im oxil-Gen; oben : die entsprechende Wildtypsequenz; unten : die Mutantensequenz. Die Insertionsstelle der T-Base im oxil-Gen der Mutante M5631 ist unterstrichen; die Aminosäuresequenz ist jeweils angezeigt.

Kurze Einführung zur molekularen Analyse der tRNA^{Ser}UCN :

Martin et al. (1982b) konnten drei mitochondriale tRNAs der Hefe *S. cerevisiae* identifizieren, welche in vitro mit der Aminosäure Serin beladbar waren. Diese drei isoakzeptierenden tRNAs werden von zwei Genen kodiert.

Das erste Gen kodiert für eine tRNA^{Ser}AGX, welche die Codons AGC und AGU liest; das Gen für diese tRNA ist im tRNA-Cluster zwischen der 21S rRNA und dem oxil-Gen lokalisiert. Das zweite Gen kodiert überraschenderweise für zwei UCN lesende tRNAs : die tRNA^{Ser}UCN1 und tRNA^{Ser}UCN2 (Martin et al. 1982b). Das Gen für diese tRNAs ist

in der var1-Region lokalisiert, und stellt somit jenes Gen dar, in welchem die Suppressormutation mfs-1 des Stammes SEG15 liegt. Dies bedeutet, daß die Suppressormutation im tRNA^{Ser}UCN-Gen zwei tRNAs betreffen sollte : tRNA^{Ser}UCN1 und UCN2.

Martin et al. (1982b) konnten zeigen, daß sich tRNA^{Ser}UCN1 und tRNA^{Ser}UCN2 nur durch die Modifikation eines Uridin zu Pseudouridin (an Pos.27 innerhalb der tRNA) unterscheiden, ansonsten aber vollkommen identische Sequenzen und Modifikationen aufweisen (siehe Abb.39). tRNA^{Ser}UCN1 enthält ein Uridin an Pos.27, tRNA^{Ser}UCN2 ein Pseudouridin an dieser Stelle. Im Hinblick darauf war es von Interesse, ob die Mutation C→U im Anticodonstamm der Suppressor tRNA^{Ser}UCN einen Einfluß auf diese Modifikation der tRNA ausübt, da Mutationsort und Modifizierungsstelle in unmittelbarer Nachbarschaft zueinander liegen (vgl. Abb.39).

7. Analyse der tRNA^{Ser}UCN-Transkripte

7.1 Northernblot-Analyse

Gesamt-mitochondriale RNA des Original- und des Suppressorstammes wurde auf eine DEAE-Säule geladen und Gesamt-tRNA daraus isoliert (siehe Material und Methoden). Gleiche Mengen an tRNAs des Originalstammes HS2-5631 und des Suppressorstammes SEG15 wurden in einem 10%-igen Acrylamidgel unter denaturierenden Bedingungen (8 M Harnstoff) aufgetrennt. Anschließend wurden die tRNA-Transkripte durch Elektroblothing auf Genescreen Plus Papier transferiert. Die Hybridisierung erfolgte mit einem 335bp langen nicktranslatiertem HpaII-Fragment, welches das tRNA^{Ser}UCN-Gen vollständig enthielt (siehe Material und Methoden).

Das Autoradiogramm des Northernblots ist in Abb.41 gezeigt. Dar- aus wird ersichtlich, daß die Transkripte der tRNA^{Ser}UCN aus dem Originalstamm HS2-5631 und dem Suppressorstamm SEG15 in gleichen Mengen vorhanden sind. Aus diesen Daten läßt sich schließen, daß der Basenaustausch C→U innerhalb der Suppressor tRNA keinen Einfluß auf die Transkriptmenge ausübt.

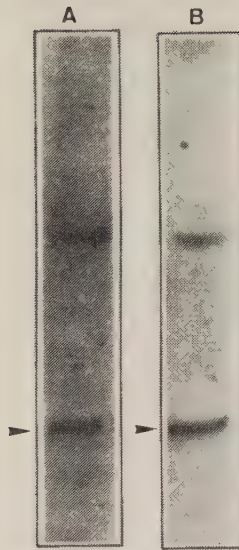


Abb.41 : Northernblot-Analyse der tRNA^{Ser}

Mitochondriale tRNA des Suppressorstammes SEG15 (A) sowie des Ausgangsstammes HS2-5631 (B) wurde in einem 10%-igen Acrylamid-Harnstoffgel aufgetrennt und anschließend auf Genescreen Plus Papier transferiert. Die Hybridisierung erfolgte mit einem nicktranslatierten DNA-Fragment, welches das tRNA^{Ser} Gen enthielt. Die reifen tRNA^{Ser} Transkripte sind durch Pfeile angezeigt; in beiden Spuren tritt zudem ein Prekursortranskript der reifen tRNA^{Ser} auf.

7.2 S1-Kartierung der tRNA^{Ser}UCN-Transkripte

7.2.1 Bestimmung des 5'-Endes

Als Hybridisierungsfragment wurde ein 120bp langes HpaII-AluI-Fragment verwendet, welches das putative 5'-Ende der tRNA^{Ser}UCN enthielt. Dieses Fragment wurde an seinen 5'-Enden mit γ -[³²P]ATP radioaktiv markiert; nach Strangtrennung wurde der zur tRNA^{Ser} komplementäre Einzelstrang mit Gesamt-tRNA aus dem jeweiligen

Stamm hybridisiert und der S1-Verdau wurde, wie in Material und Methoden beschrieben, durchgeführt.

7.2.2 Bestimmung des 3'-Endes

Als Hybridisierungsfragment wurde ein 215bp langes AluI-HpaII-Fragment verwendet, welches das putative 3'-Ende der tRNA^{Ser}UCN enthielt; dieses Fragment war an seinem 3'-Ende mit α -[³²P]ddATP unter Verwendung von Terminaler Transferase radioaktiv markiert. Im weiteren wurde wie unter 7.2.1 beschrieben vorgegangen.

Wie in Abb.42 gezeigt, weisen die tRNA^{Ser}UCN-Transkripte aus Original- und Suppressorstamm identische 5'- bzw. 3'-Enden auf. Diese stimmen exakt mit den von Martin et al. (1982b) bestimmten und sequenzierten Enden der tRNA^{Ser}UCN überein.

Dies bedeutet, daß die Suppressormutation C→U innerhalb der tRNA keinen Einfluß auf die Prozessierung dieser tRNA ausübt. Die tRNA^{Ser}UCN wird also im Suppressorstamm in Wildtypmengen transkribiert und auch an gleichen Positionen wie im Wildtyp prozessiert. Um Aussagen über die Konformation der Suppressor tRNA^{Ser}UCN machen zu können, sollte nun eine zweidimensionale Gelelektrophorese durchgeführt werden.

8. Zweidimensionale Gelelektrophorese von tRNAs des Originalstammes HS2-5631 und des Suppressorstammes SEG15

8.1 Radioaktive Markierung von tRNAs

Mit Hilfe von cytoplasmatischer tRNA-Nukleotidyltransferase wurde an das 3'-Ende der jeweiligen tRNAs ihr CCA-Trinukleotid synthetisiert. Unter Verwendung von radioaktiven α -[³²P]ATP und kaltem CTP konnten die tRNAs aus Original- und Suppressorstamm radioaktiv markiert werden (siehe Material und Methoden).

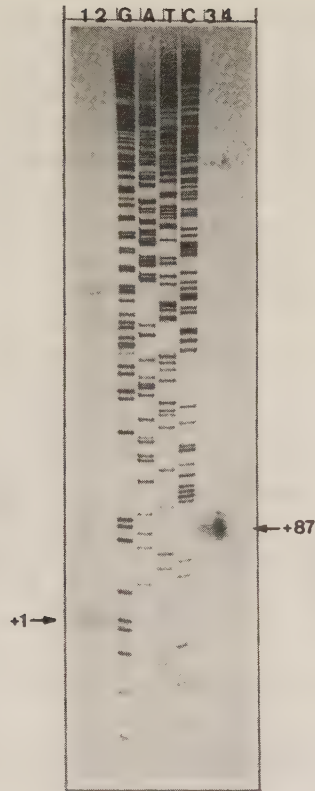


Abb.42 : Bestimmung des 5'- und 3'-Endes der tRNA^{Ser} im Stamm HS2-5631 bzw. SEG15 durch S1-Kartierung

Bestimmung des 5'-Endes :

Isolierte tRNA des Suppressorstammes SEG15 (1) sowie des Ausgangsstammes HS2-5631 (2) wurde mit einem nicktranslatierten DNA-Fragment hybridisiert, welches das putative 5'-Ende (+1) der tRNA^{Ser} (nach Martin et al., 1982b) enthält; der jeweilige Hybridisierungsansatz wurde mit S1-Nuklease verdaut und die protegierten Fragmente anschließend in einem 8%-igen Acrylamid-Harnstoffgel aufgetrennt.

Bestimmung des 3'-Endes :

Isolierte tRNA des Suppressorstammes SEG15 (3) sowie des Ausgangsstammes HS2-5631 (4) wurde mit einem nicktranslatierten Fragment hybridisiert, welches (nach Martin et al., 1982b) das putative 3'-Ende (+87) der tRNA^{Ser} enthält; nach Verdau mit S1-Nuklease wurden die protegierten Fragmente in einem 8%-igen Acrylamid-Harnstoffgel aufgetrennt. Als Längenmarker wurde eine bekannte M13-Vergleichssequenz (G, A, T, C) aufgetragen.

8.2 Zweidimensionale Gelelektrophorese

Die radioaktiv markierten tRNAs wurden einer zweidimensionalen Gelelektrophorese unterzogen, wie in Material und Methoden beschrieben. In Abb.43 ist das Autoradiogramm eines Geles nach zweidimensionaler Auftrennung der tRNAs gezeigt. Die einzelnen radioaktiven "Spots" waren von Martin et al. (1982b) bereits analysiert und sequenziert worden, sodaß diesen Spots einzelne tRNA-Spezies zugeordnet werden konnten.

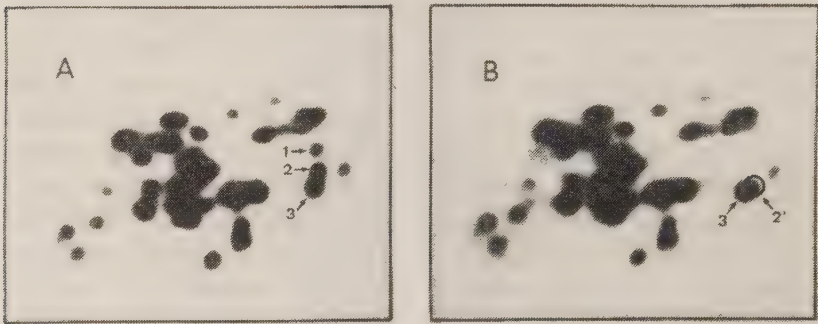


Abb.43 : 2D-Gelelektrophorese mitochondrialer tRNAs des Originalstammes HS2-5631 und des Suppressorstammes SEG15

A) Mitochondriale tRNAs des Originalstammes HS2-5631; 1 und 2 bezeichnen $tRNA^{SerUCN1}$ und 2; $tRNA^{Leu}$ ist mit 3 angegeben.
B) Mitochondriale tRNAs des Suppressorstammes SEG15; 2' bezeichnet die Suppressor $tRNA^{SerUCN}$, 3 die $tRNA^{Leu}$.

Das Autoradiogramm des Wildtypstammes HS2-5631 (Abb.43A) zeigt das typische Wildtypmuster mitochondrialer tRNAs (einschließlich geringer Verunreinigungen mit cytoplasmatischen tRNAs). Das mitochondriale tRNA-Muster des Suppressorstammes SEG15 weicht an zwei Stellen davon ab. Es fehlen dort die Spots für $tRNA^{SerUCN1}$ und $tRNA^{SerUCN2}$ an ihren Wildtyppositionen. Statt dessen taucht ein neuer Spot in unmittelbarer Nähe des $tRNA^{Leu}$ Spots auf (Abb.43B). Um zu bestätigen, daß es sich bei diesem Spot um die mutierte Suppressor $tRNA^{SerUCN}$ handelt, wurde die tRNA

dieses Spots aus dem Gel eluiert und einer Sequenzanalyse unterzogen (siehe Material und Methoden).

9. tRNA^{Ser}UCN Sequenzierung

9.1 T₁-Ribonuklease-Sequenzierung

Als Referenz wurden aus dem Originalstamm HS2-5631 die tRNAs der Spots für tRNA^{Leu} und für tRNA^{Ser}UCN1 und 2 aus dem Gel eluiert und einer limitierten enzymatischen Spaltung mit T₁-Ribonuklease unterzogen (siehe Material und Methoden). T₁-Ribonuklease schneidet an nicht modifizierten Guaninbasen, sodaß nach Auftrennung der Fragmente in einem 10%-igen Acrylamidgel (8 M Harnstoff), ein Sequenzmuster für nicht modifizierte G-Basen der jeweiligen tRNA erhalten wird. Analog dazu wurden vom Suppressorstamm SEG15 der Spot für die tRNA^{Leu} und der im Verhältnis zum Originalstamm neu hinzugekommene tRNA-Spot in unmittelbarer Nähe zur tRNA^{Leu} einem Verdau mit T₁-Nuklease unterzogen (vgl. Abb.43B).

Durch die Auftrennung der Spaltfragmente in einem 10%-igen Acrylamidgel konnte bestätigt werden, daß der Spot in unmittelbarer Nähe des tRNA^{Leu} Spots im Suppressorstamm SEG15 die Suppressor-tRNA^{Ser}UCN darstellt. Dies wurde aus dem Vergleich der T₁-Sequenzmuster aus Original- und Suppressorstamm ersichtlich (siehe Abb.44).

Aus diesen Befunden läßt sich ableiten, daß im Suppressorstamm SEG15 die tRNA^{Ser}UCN nicht in zwei unterschiedliche Spots (tRNA^{Ser}UCN1 und 2) aufgetrennt werden kann, sondern in einem Spot in unmittelbarer Nähe zum tRNA^{Leu}-Spot lokalisiert ist. Im Originalstamm HS2-5631 ist das unterschiedliche Laufverhalten der beiden tRNA^{Ser}UCN1 und 2 im zweidimensionalen Gel nur durch den Modifikationsunterschied an Pos.27 bedingt (siehe oben). Das war bereits ein erster Hinweis darauf, daß in der Suppressormutante keine zwei Formen der tRNA^{Ser}UCN auftreten. Da sich im Originalstamm beide tRNAs nur durch die Modifikation, bzw. Nichtmodifikation eines Uridin an Pos.27 unterscheiden, stellte sich nun die

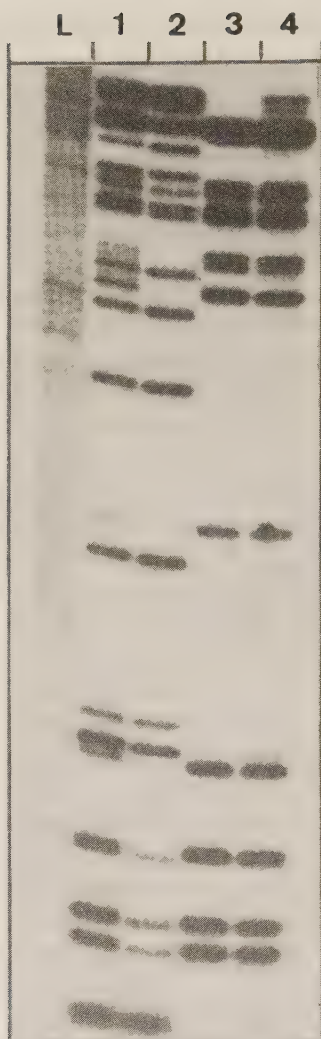


Abb.44 : Sequenzgel eines Partialverdaues mit T_1 RNase

Spur 1 : Neu auftretender tRNA Spot (2' vgl. Abb.43B) im Stamm SEG15; Spur 2 : tRNA^{Ser}UCN2 im Stamm HS2-5631; Spur 3 : tRNA^{Leu} (HS2-5631); Spur 4 : tRNA^{Leu} (SEG15); L : Sequenzleiter.

Frage, ob die Suppressor tRNA^{Ser}UCN an dieser Stelle in modifiziertem oder nicht modifiziertem Zustand vorlag. Dies sollte durch chemische Sequenzierung nachgewiesen werden.

9.2 Modifikationsbestimmung der tRNA^{Ser}UCN

Durch chemische Sequenzierung (Modifikation mit Hydrazin, Spaltungsreaktion mit Anilin, siehe Material und Methoden) wurde der Modifikationszustand an Pos.27 der Suppressor tRNA^{Ser}UCN ermittelt. Zum besseren Verständnis der Ergebnisse wird eine kurze Erläuterung des theoretischen Hintergrundes dieser Methode gegeben. Da die Modifikation an Pos.27 an einer U-Base stattfindet, wurde nur die Reaktion für U-Basen durchgeführt : falls eine U-Base in nicht modifiziertem Zustand vorliegt, kann bei chemischer Sequenzierung der tRNA eine Spaltung an dieser Base erfolgen, an entsprechender Stelle im Autoradiogramm des Sequenzgeles taucht deshalb eine Bande auf; falls aber die U-Base in modifiziertem Zustand vorliegt, ist eine Spaltung nicht möglich; dies macht sich durch Fehlen einer Bande an der entsprechenden Stelle im Autoradiogramm des Sequenzgeles bemerkbar (Peattie, 1979). Auf diese Weise können Modifikationen an tRNA-Basen sehr leicht nachgewiesen werden, ohne freilich die Art der Modifikation zu bestimmen.

Wie in Abb.45 gezeigt, taucht bei chemischer Sequenzierung (U-Reaktion) der Suppressor tRNA^{Ser}UCN an Pos.27 eine Bande auf; dies bedeutet, eine chemische Spaltung an dieser Stelle ist möglich, folglich ist die U-Base an dieser Position nicht modifiziert; d.h. die im Suppressorstamm SEG15 vorkommende tRNA^{Ser}UCN liegt nur in der an Pos.27 nicht modifizierten Form vor.

Zur Kontrolle wurden entsprechend tRNA^{Ser}UCN1 und 2 des Originalstammes HS2-5631 analysiert. Tatsächlich taucht bei der an Pos.27 nicht modifizierten tRNA-Spezies, tRNA^{Ser}UCN1, eine Bande an dieser Stelle auf, bei der modifizierten Form, tRNA^{Ser}UCN2 fehlt diese Bande (Abb.45A). Dies ist somit auch eine Bestätigung der Ergebnisse von Martin et al. (1982b).

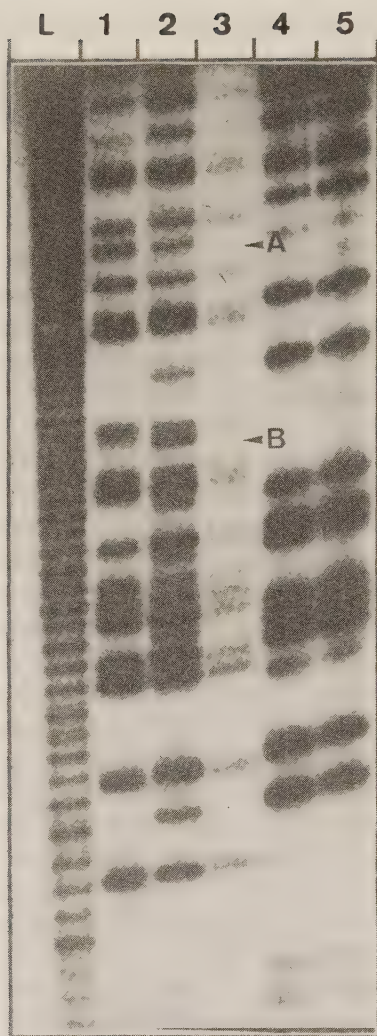


Abb.45 : Chemische Sequenzierung von tRNAs (U-Reaktion)

L : Sequenzleiter; Spur 1 : tRNA^{Ser}UCN2 (HS2-5631); Spur 2 : tRNA^{Ser}Sup (SEG15); Spur 3 : tRNA^{Ser}UCN1 (HS2-5631); Spur 4 : tRNA^{Leu} (HS2-5631); Spur 5 : tRNA^{Leu} (SEG15). A) Modifikationsstelle U→Ψ an Pos.27 der tRNA^{Ser}UCN : tRNA^{Ser}UCN2 und tRNA^{Ser}SUP können an dieser Stelle gespalten werden und tragen deshalb an Pos.27 keine Modifikation (siehe Text). B) Primärmutation C→T (U) in der tRNA^{Ser}Sup, wodurch eine zusätzliche Bande auftritt.

Bei der chemischen Sequenzierung der Suppressor tRNA^{Ser}UCN konnte gleichzeitig die DNA-Primärmutation C→U (Pos.42) innerhalb des tRNA^{Ser}-Genes des Suppressorstammes SEG15 auf RNA-Ebene bestätigt werden. In der U-Reaktion der Sequenzierung sollte an Pos.42 eine zusätzliche Bande auftreten. Wie in Abb.45B zu sehen, ist dies der Fall. Dies zeigt gleichzeitig, daß die U-Base an Pos.42 in nicht modifiziertem Zustand vorliegt, da an dieser Position eine Spaltung erfolgen kann (siehe oben).

Zusammenfassend läßt sich somit sagen, daß der Suppressorstamm SEG15 im Gegensatz zum Ursprungstamm HS2-5631 nur noch eine tRNA^{Ser}UCN-Spezies enthält. Diese tRNA^{Ser}UCN trägt die Mutation C→U an Pos.42 und ist an Pos.27 nicht modifiziert.

10. Strukturanalyse der Suppressor tRNA^{Ser}UCN

Um zu untersuchen, ob die räumliche Struktur der nicht modifizierten Suppressor tRNA^{Ser}UCN, die im weiteren als tRNA^{Ser}Sup bezeichnet wird, sich von den räumlichen Strukturen der Wildtyp tRNA^{Ser}UCN1 und 2 unterscheidet, wurde ein Northernblot unter nicht denaturierenden Bedingungen durchgeführt.

Bisherige Untersuchungen (denaturierender Northernblot, zweidimensionale Gelelektrophorese) wurden jeweils unter denaturierenden, bzw. partiell denaturierenden Bedingungen durchgeführt, d.h. Sekundärstrukturen der tRNAs wurden zum Teil aufgefaltet. In diesem Ansatz sollten mitochondriale tRNAs aus Suppressor- und Originalstamm in einem 10%-igen nativen Acrylamidgel aufgetrennt, und nach Transfer auf Genescreen Plus Papier, mit einer nicktranslatierten Probe aus dem tRNA^{Ser}-Gen hybridisiert werden ("nativer Northernblot", siehe Material und Methoden). Die Auftrennung der tRNAs erfolgt bei dieser Methode in erster Linie hinsichtlich der räumlichen Struktur der Moleküle.

Wie in Abb.46A gezeigt, tauchen im Originalstamm HS2-5631 zwei Banden auf. Sie stellen tRNA^{Ser}UCN1 und 2 dar. Der Modifikationsunterschied von nur einer Base (Uridin→Pseudouridin, Pos.27) hat also erhebliche Auswirkungen auf das Laufverhalten und somit auf die räumliche Struktur der tRNAs. Wie im vorigen Abschnitt dargestellt, fehlt der tRNA^{Ser}Sup im Suppressorstamm SEG15 diese Modi-

fikation, es existiert keine an dieser Stelle modifizierte Form der tRNA. Die entsprechende Bande fehlt daher auch im Northernblot bei Vergleich mit den Wildtyp-tRNAs^{Ser}.

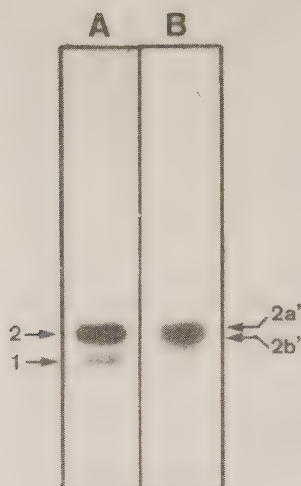


Abb.46 : tRNA^{Ser}UCN Transkripte des Originalstammes HS2-5631 (A) und des Suppressorstammes SEG15 (B), unter nicht denaturierenden Bedingungen aufgetrennt

Mitochondriale tRNA der jeweiligen Stämme wurde in einem 10%-igen nativen Acrylamidgel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran der Marke Zeta-Probe transferiert und mit einem nicktranslatierten DNA-Fragment hybridisiert, welches das tRNA^{Ser}UCN Gen enthält.

A) Originalstamm HS2-5631 : 1 und 2 stellen tRNA^{Ser} UCN1 und 2 dar. B) 2a' und 2b' scheinen unterschiedliche Konformationen der tRNA^{Ser}Sup im Suppressorstamm SEG15 zu repräsentieren.

Überraschenderweise scheint die nicht modifizierte tRNA^{Ser}Sup der Suppressormutante SEG15 in zwei Konfigurationen aufzutreten (siehe Abb.46B) : zwei Banden sind im Autoradiogramm des nativen Northernblots zu sehen. Die beiden Strukturen der tRNA tauchen etwa im Verhältnis 1:1 auf. Es ist zu vermuten, daß die Primärmutation C→U innerhalb der tRNA und der daraus resultierende Modifikationsverlust an Pos.27 die räumliche Struktur derartig de-

stabilisieren, daß zwei Konfigurationen der tRNA^{Ser}Sup möglich sind (siehe Diskussion).

11. Aminoacylierung von Suppressor- und Wildtyp-tRNA^{Ser}

Um zu untersuchen, ob die Änderung der räumlichen Struktur der tRNA^{Ser}Sup auch Auswirkungen auf ihre Beladbarkeit mit der Aminosäure Serin hat, wurden in vitro Beladungsstudien mit ³H-Serin durchgeführt. Als interner Standard, um die Beladbarkeit von Suppressor- und Wildtyp-tRNA miteinander vergleichen zu können, wurden parallel dazu Beladungsstudien mit tRNA^{Tyr} durchgeführt (siehe Material und Methoden).

Als Beladungsenzym wurde ein Isolat von *E. coli* Aminoacylsynthetasen verwendet. Dies hat den Vorteil, daß damit weder die cytoplasmatischen tRNAs^{Ser} noch die mitochondriale tRNA^{Ser}AGX beladen werden können, sondern spezifisch nur die tRNA^{Ser}UCN (Baldacci et al. 1976).

11.1 Beladungskinetik

Bei 35°C wurden 100 µg gesamt mitochondrialer tRNA aus Suppressor- und Originalstamm (SEG15 bzw. HS2-5631) mit ³H-Serin unter Verwendung von *E. coli* Aminoacylsynthetasen beladen (siehe Material und Methoden). Dabei wurden zu verschiedenen Zeiten Proben entnommen, d.h. eine Beladungskinetik wurde erstellt (Abb.47).

Der entsprechende Versuch wurde mit der Aminosäure ³H-Tyrosin als interner Standard durchgeführt (da Suppressor- und Originalstamm eine Wildtyp tRNA^{Tyr} enthalten, sollten sie identische Beladungskinetiken aufweisen, siehe Abb.47).

Die Ergebnisse zeigen, daß bei Bedingungen, unter denen im Suppressor, bzw. Originalstamm tRNA^{Tyr} mit gleicher Effizienz beladen wird, tRNA^{Ser}UCN im Suppressorstamm SEG15 nur mit einer Effizienz von 80% im Vergleich zum Originalstamm HS2-5631 beladen wird. Dies deutet darauf hin, daß die Suppressormutation mfs-1 innerhalb der tRNA^{Ser}Sup auch deren Beladbarkeit beeinflußt. Eine

Reduzierung der Beladbarkeit um ca. 20% kann jedoch nicht als drastisch bezeichnet werden.

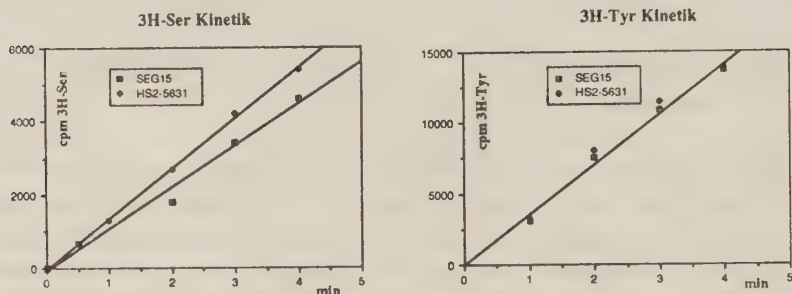


Abb.47 : Acylierungskinetik der tRNA^{Ser}UCN

Links : ³H-Serin Acylierungskinetik der tRNA^{Ser}UCN im Originalstamm HS2-5631 und Suppressorstamm SEG15; rechts : als interner Standard um tRNAs des Originalstammes und des Suppressorstammes miteinander vergleichen zu können, wurden parallel dazu Beladungsstudien mit ³H-Tyrosin durchgeführt.

11.2 Test auf Maximalbeladung der tRNA^{Ser}UCN

Um zu untersuchen, ob die Veränderung der räumlichen Struktur der tRNA^{Ser}Sup weitere Aminoacylierungsparameter beeinflusst, wurden *in vitro* Beladungsstudien mit steigenden Mengen an mitochondrialen tRNAs der Stämme SEG15 und HS2-5631 durchgeführt (bei konstanter Beladungszeit von 10 min). Dabei wurden (wie oben beschrieben) als radioaktiv markierte Aminosäure ³H-Serin und als interner Standard ³H-Tyrosin verwendet (siehe Material und Methoden). Wie in Abb.48 gezeigt, weisen Original- und Suppressorstamm gleiche Maximalbeladungswerte für tRNA^{Tyr} auf.

Jedoch kann im Suppressorstamm SEG15 die tRNA^{Ser}Sup nur zu ca. 80% mit der Aminosäure Serin beladen werden (im Originalstamm HS2-5631 wird dazu die Beladung der tRNA^{Ser}UCN mit 100% angesetzt, siehe Abb.48). Dies bedeutet, daß die Suppressor tRNA^{Ser}Sup nicht nur langsamer mit der Aminosäure Serin beladen wird als die entsprechende Wildtyp-tRNA (siehe oben), sondern auch ihr Maximalbeladungswert um ca. 20% vermindert ist.

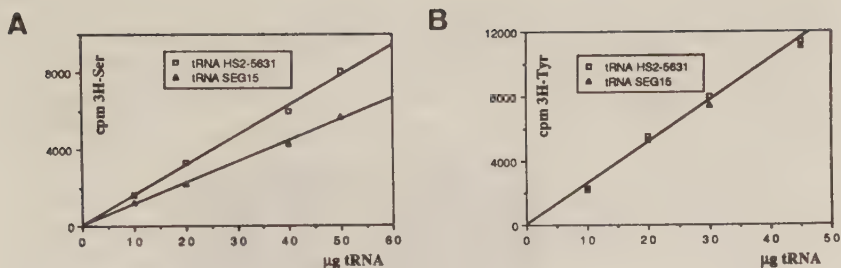


Abb.48 : Maximalbeladung der tRNA^{SerSup}

A) Die Beladung der tRNAs^{SerUCN} von Originalstamm HS2-5631 und Suppressorstamm SEG15 mit ^3H -Serin wurde bei konstanter Beladungszeit (10 min) und steigenden Mengen an mitochondrialen tRNAs durchgeführt. B) Als interner Standard um Suppressor- und Wildtyp tRNAs miteinander vergleichen zu können, wurden parallel dazu Beladungsstudien mit ^3H -Tyrosin durchgeführt.

12. Die tRNA^{SerSUP} im Stamm M5631

Die Suppressor tRNA^{SerSup} wurde, wie beschrieben, im Stamm HS2-5631 isoliert. Dieser Stamm ist durch zwei mitochondriale Mutationen charakterisiert : die erste stellt die Rasterschubmutation M5631 im oxil-Gen dar, die zweite die "restriktive Mutation" par^r-454, welche eine Reduzierung der natürlichen Rasterschubsuppression im oxil-Gen bewirkt. Die Suppressormutation mfs-1 innerhalb der tRNA^{SerUCN} wirkt im Stamm SEG15 dieser - durch die par^r-454 Mutation bedingten - Reduzierung der Rasterschubsuppression entgegen; d.h. die Mutationen in der tRNA, bzw. 15S rRNA verhalten sich antagonistisch.

Nun sollte die Wirkung der tRNA^{SerSup} auf die Rasterschubmutation im oxil-Gen ohne die antagonistische Wirkung der par^r-454 Mutation untersucht werden. Dazu wurde die Ausgangsmutante für alle diese Untersuchungen, die Rasterschubmutante M5631 mit einem rho⁻-Stamm gekreuzt, welcher die tRNA^{Ser}-Suppressormutation trug, der rho⁻-Stamm SEG15/S1.

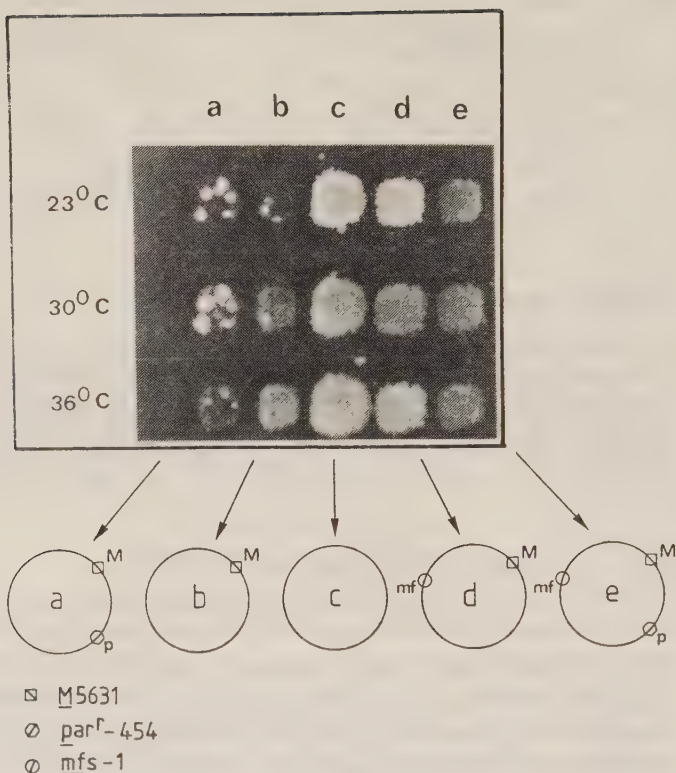


Abb.49 : Phänotyp aller in dieser Arbeit untersuchten Mutanten auf nicht vergärbarem Medium bei drei Temperaturen

Oben : a) der reduziert leaky wachsende Stamm HS2-5631, entstanden durch Integration der par^r-454 Mutation in das mitochondriale Genom der Mutante M5631; b) die leaky wachsende Mutante M5631; c) der zugehörige Wildtypstamm 777-3A; d) "fast Wildtypwachstum" der Doppelmutante M5631-mfs-1 (siehe Text); e) der leaky wachsende Suppressorstamm SEG15 (da die Stämme M5631 bzw. 777-3A die rezessive Kernmutation opl tragen, welche auf nicht vergärbaren Medien zur Atmungsdefizienz führt, wurden diese Stämme mit einem rho^0 -Stamm gekreuzt, welcher das Wildtypallel zur opl Mutation enthält).

Unten : Mitochondriale Genome der jeweiligen Stämme; die entsprechenden mitochondrialen Mutationen sind eingezeichnet

Da der Rasterschubmutante M5631 die "restriktive $\text{par}^{\text{r-454}}$ Mutation" fehlt, zeigt sie auf Grund natürlicher Rasterschubsuppression leaky Wachstum. Wird in diesen Stamm die tRNA^{Ser} -Suppressor-mutation eingekreuzt (unter Verwendung des rho^- -Stammes SEG15/S1), so zeigt diese Doppelmutante (M5631-mfs-1) fast Wildtypwachstum (siehe Abb.49d); d.h. die beobachtete natürliche Rasterschubsuppression im Stamm M5631 kann durch die Suppressor $\text{tRNA}^{\text{SerSup}}$ noch erheblich gesteigert werden, sodaß die resultierende Doppelmutante in ihrem Wachstum kaum von Wildtypzellen unterschieden werden kann. In Abb.49 sind alle mitochondrialen Genomvariationen mit den jeweils von ihnen verursachten Phänotypen auf nicht vergärbaren Medien dargestellt.

Diskussion

In Kapitel I wurde die $\text{par}^r\text{-454}$ Mutation im Gen für die mitochondriale 15S rRNA als die Mutation identifiziert, welche die spontane Rasterschubsuppression der Rasterschubmutante M5631 erheblich reduziert.

In diesem Teil der Arbeit wurde eine Suppressormutation (mfs-1) im Stamm HS2-5631 isoliert und charakterisiert, welche in der Lage ist, die durch die $\text{par}^r\text{-454}$ Mutation bedingte Reduzierung der natürlichen Rasterschubsuppression zu kompensieren. Diese mfs-1 Suppressormutation bewirkt somit eine Verstärkung der Rasterschubsuppression in diesem Stamm. Da eine erhöhte Rasterschubsuppression auf eine Erhöhung der Translationsungenauigkeit schließen läßt, war zu vermuten, daß die Suppressormutation mfs-1 in einem jener Gene lokalisiert ist, die an der Einhaltung der Translationsgenauigkeit in Mitochondrien beteiligt sind.

Durch ρ^- -Deletionskartierung war es möglich, den Mutationsort der mfs-1 -Suppressormutation auf einem mitochondrialen 2000bp langen Genomfragment einzugrenzen, welches im ρ^- -Stamm SEG15/S1 zurückbehalten wird. Die DNA-Sequenzanalyse dieses 2000bp Fragmentes ergab, daß in diesem mitochondriale Genombereich zwei Gene kodiert sind. Es sind dies : das Gen für die mitochondriale Serin-tRNA ($\text{tRNA}^{\text{SerUCN}}$), welche die Codons UCU, UCA, UCG und UCC (=UCN) lesen kann; des weiteren das var1 -Gen, das einzige mitochondriale Gen, welches für ein mito-ribosomales Protein kodiert (Hudspeth et al., 1982).

Durch Vergleich der DNA-Sequenz des Ausgangsstammes HS2-5631 mit der des Suppressorstammes SEG15 konnte die mfs-1 Suppressormutation innerhalb des Genes für die mitochondriale $\text{tRNA}^{\text{SerUCN}}$ lokalisiert werden. Diese tRNA Mutante stellt damit den ersten Fall einer mitochondrial kodierten Rasterschubsuppressor tRNA dar. Außerdem wies die Analyse der tRNA-Suppressormutation auf einen völlig neuen Typ einer +1 Rasterschubsuppressor-tRNA hin (als +1 Rasterschubsuppressor-tRNA wird eine tRNA bezeichnet, welche in der Lage ist eine +1bp Rasterschubmutation zu supprimieren, im vorliegenden Fall die Rasterschubmutation M5631). Im Gegensatz zu allen anderen +1 Rasterschubsuppres-

sor-tRNAs, die bis zu diesem Zeitpunkt untersucht waren (Cummins et al., 1982; Gaber und Culbertson, 1982; Bossi und Smith, 1984; Riddle und Carbon, 1973), trägt diese Suppressor tRNA - als tRNA^{SerSup} bezeichnet - ihre Mutation außerhalb der Anticodon-Schleife des tRNA-Moleküles. Dabei erwies sich die mfs-1 Suppressormutation als C→T Basentransition an Pos.42 des tRNA^{SerUCN}-Genes. Der Basenaustausch C→T führt zur Umwandlung einer G-C in eine G•U Basenpaarung im Anticodon-Stamm der tRNA^{SerSup}.

Die bis dahin in Pro- und Eukaryonten untersuchten +1 Rasterschubsuppressor-tRNAs enthielten Suppressormutationen als Insertion einer zusätzlichen Base in ihrer Anticodon-Schleife. Dabei wurde diese Base entweder in das Anticodon selbst (Riddle und Carbon, 1973) oder in die daran angrenzenden Basen der Anticodon-Schleife inseriert (Cummins et al., 1982; Gaber und Culbertson, 1982; Bossi und Smith, 1984). Die Insertion einer zusätzlichen Base bewirkt, daß die Anticodon-Schleife aller bekannter +1 Rasterschubsuppressor-tRNAs acht statt der sieben Basen aufweist, die in Wildtyp-tRNAs die Anticodon-Schleife bilden.

Von diesen Befunden ausgehend, schlugen Cummins et al. (1985) folgendes Modell der +1 Rasterschubsuppression vor. Danach genügt das Vorhandensein einer zusätzlichen Base innerhalb der Anticodon-Schleife einer tRNA, um auf Grund einer vier Basen Translokation einen +1 Rasterschub auszulösen; falls sich dieses Modell als richtig erweisen sollte, bedeutet dies, daß die Struktur und Größe der tRNA-Anticodon-Schleife eine entscheidende Rolle während der Translokation bezüglich der Translationsgenauigkeit (d.h. Einhaltung des Triplettleserahmens) einnimmt. Andererseits sollte somit die Beibehaltung einer aus sieben Basen bestehenden Anticodon-Schleife in beinahe allen Wildtyp tRNAs die Genauigkeit der Tripletttranslokation maximieren.

Die einzige Ausnahme von diesem Modell schien bis dahin eine kernkodierte Prolin-Rasterschubsuppressor tRNA (SUF7) der Hefe *S. cerevisiae* zu bilden. Winey et al. (1986) isolierten diese tRNA-Mutante, welche ihre Suppressormutation an Pos.39 im Anticodon-Stamm des tRNA Moleküles trägt. Durch diese Mutation (ein Basenaustausch G→U) wird jedoch gleichzeitig die Ausbildung einer Watson-Crick-Paarung am ersten Basenpaar des Anticodon-

Stammes der tRNA^{Pro} verhindert. Dies führt zu einer Erweiterung der Anticodon-Schleife, die dadurch aus neun Basen besteht. Insofern widerspricht diese Suppressor-tRNA nicht dem Modell von Cummins et al. (1985), welches besagt, daß eine +1 Raster-schubsuppression immer durch tRNAs mit vergrößerter Anticodon-Schleife verursacht wird.

Demnach bildet die in dieser Arbeit vorgestellte tRNA^{SerSup} tatsächlich die bis dahin einzige Ausnahme dieses Modells einer +1 Rasterschubsuppression. Die tRNA^{SerSup} besitzt nämlich, wie alle Wildtyp tRNAs, sieben Basen in ihrer Anticodon-Schleife und trägt ihre Suppressormutation im Anticodon-Stamm. Dieser Befund impliziert, daß auch andere Bereiche außerhalb der Anticodon-Schleife einer tRNA an der Einhaltung der Translationsgenauigkeit (bezüglich Beibehaltung des Leserahmens) beteiligt sind. Entsprechende Untersuchungen von Mahony et al. (1989) an einer tRNA^{Gly}-Suppressormutante zeigten, daß eine -1 Rasterschubsuppression (die Suppression einer -1bp Rasterschubmutation) durch eine tRNA verursacht werden kann, deren Suppressormutation - außerhalb der Anticodon-Schleife - in der TΨC-Schleife der tRNA lokalisiert ist.

Da die tRNA^{SerSup} eine Sonderstellung unter allen Suppressor-tRNAs einnimmt, war das Ziel der weiteren Analysen, ein Modell über den Mechanismus der Rasterschubsuppression durch diese tRNA aufstellen zu können. Voraussetzung hierfür waren zunächst Untersuchungen über Transkription, Modifikation und Struktur dieses Moleküles.

Transkription und Prozessierung

Es gibt einige Beispiele dafür, daß Basenänderungen innerhalb eines tRNA-Genes dessen Transkription (De Franco et al., 1980; Koski et al., 1980) und die Prozessierung der tRNA beeinflussen (Altman, 1974; McClain et al., 1975). Jedoch scheint der Basenaustausch C→T innerhalb des tRNA^{SerSup}-Genes weder die Transkription noch die Prozessierung dieser tRNA zu verändern : im Suppressorstamm SEG15 und Originalstamm HS2-5631 (in dem die Suppressormutation induziert wurde) werden die gleichen Mengen an

tRNA^{Ser}UCN-Transkripten gefunden.

Auch die Prozessierung der tRNA^{Ser}UCN erfolgt in beiden Stämmen gleich. Die 5'- und 3'-Enden der tRNA^{Ser}Sup des Suppressorstammes stimmen mit den 5'- und 3'-Enden der tRNA^{Ser}UCN des Originalstammes HS2-5631 vollkommen überein. Somit verhält sich tRNA^{Ser}Sup hinsichtlich ihrer Transkription und Prozessierung wie ihr Wildtypendant im Originalstamm HS2-5631.

Modifikationsuntersuchungen

Bezüglich der Modifikation konnten Martin et al. (1982b) zeigen, daß die Wildtyp tRNA^{Ser}UCN innerhalb der mitochondrialen tRNAs eine Besonderheit darstellt : diese tRNA tritt in zwei unterschiedlich modifizierten Formen auf, tRNA^{Ser}UCN1 und tRNA^{Ser}UCN2. Beide Spezies werden durch dasselbe Gen kodiert. tRNA^{Ser}UCN1 und 2 unterscheiden sich lediglich durch die posttranskriptionale Modifikation eines Uridin an Pos.27 im Anticodon-Stamm der tRNAs. An dieser Stelle weist tRNA^{Ser}UCN1 ein modifiziertes Uridin (nämlich Pseudouridin) auf, während tRNA^{Ser}UCN2 ein nicht modifiziertes Uridin an Pos.27 enthält. Die dritte Serin-isoakzeptierende tRNA in Mitochondrien, tRNA^{Ser}AGX, dekodiert die Codons AGU und AGC. Ihre Basensequenz ist nur zu 43% homolog zur Basensequenz der tRNA^{Ser}UCN1 und 2.

Bereits 1976 beobachteten Baldacci et al., daß abhängig vom Wachstumszustand von Hefezellen, unter Glukoserepression, bzw. Glukosederepression, unterschiedliche tRNA^{Ser}-Spezies aus Mitochondrien isoliert werden konnten; da aber zu diesem Zeitpunkt keine tRNA^{Ser} Sequenzanalysen vorlagen, konnten die abhängig vom Wachstumszustand auftretenden tRNA^{Ser}-Spezies nicht tRNA^{Ser}UCN1, tRNA^{Ser}UCN2 oder tRNA^{Ser}AGX zugeordnet werden. Jedoch vermuteten Martin et al. (1982b) auf Grund oben genannter Befunde eine funktionelle Bedeutung der Modifikation an Pos.27 des tRNA^{Ser}UCN-Moleküles im Derepressionsprozeß der Hefeatmung.

Eine solche regulative Funktion von tRNA Modifikationen wurde bei *Salmonella typhimurium* gefunden : Das Enzym, welches in diesem Organismus die Modifikation von Uridin zu Pseudouridin

innerhalb eines tRNA-Moleküles katalysiert, wurde als Pseudouridylat Synthetase I identifiziert. Mutationen im Gen für dieses Enzym führen zur Untermodifikation von *S. typhimurium* tRNAs, was die Derepression des Histidin-Operons in diesem Stamm zur Folge hat (Roth et al., 1966; Bossi und Roth, 1980). Wie jedoch fehlende Modifikation einer tRNA und Derepression eines Operons miteinander korreliert sind, konnte bis zum heutigen Zeitpunkt nicht eindeutig geklärt werden.

Der in dieser Arbeit untersuchten Suppressor tRNA^{SerSup} fehlt die Modifikation eines Uridin zu Pseudouridin an Pos.27 des tRNA Moleküles. Nur die, an dieser Stelle nicht modifizierte Spezies tritt im Suppressorstamm SEG15 auf, während im Ausgangsstamm HS2-5631 sowohl die modifizierte wie die nicht modifizierte Form dieser tRNA vorhanden ist. Es konnten jedoch keine Unterschiede hinsichtlich der Fähigkeit beider Stämme beobachtet werden, unter Glukose reprimierten wie dereprimierten Bedingungen zu wachsen (Ergebnisse nicht gezeigt). Dies würde eine regulative Funktion der Modifikation an Pos.27 - zumindest bezüglich tRNA^{SerSup} - weitgehend ausschließen.

Das Fehlen der Modifikation an Pos.27 der tRNA^{SerSup} ist unmittelbar eine Folge der Primärmutation C→U an Pos.42 im Anticodon-Stamm dieser tRNA. Dies bestätigen frühere Befunde von Curran und Yarus (1986). Die Autoren konnten zeigen, daß bestimmte Mutationen innerhalb des Anticodon-Stammes einer amber-Suppressor tRNA^{Trp} (Su7) die Modifikation von Basen des Anticodon-Stammes vollständig eliminierten. Die C→U Primärmutation innerhalb des Anticodon-Stammes der tRNA^{SerSup} liegt in unmittelbarer Nähe zur Modifikationsstelle der U-Base an Pos.27. Es können zwei Möglichkeiten diskutiert werden, wie die C→U Primärmutation die Modifikation dieser Base verhindert :

Zum einen wird durch den C→U Basenaustausch an Pos.42 im Anticodon-Stamm eine G-C in ein G•U Basenpaarung überführt. Dies könnte zu einer veränderten Anticodon-Stamm Struktur und damit zum Modifikationsverlust an Pos.27 führen. Zum anderen besteht die Möglichkeit, daß die C-Base an Pos.42 der tRNA^{SerUCN} "per se" als Erkennungssignal für das Modifikationsenzym benötigt wird.

Welche der beiden Möglichkeiten in Betracht zu ziehen ist, wird

jedoch erst nach Untersuchung weiterer Mutationen im Anticodon-Stamm der tRNA^{Ser}UCN geklärt werden können.

Struktur und Stabilität der tRNA^{Ser}Sup

Die Untermodifikation an Pos.27 der tRNA^{Ser}Sup bedingt gleichzeitig strukturelle Änderungen des tRNA Moleküles. Dies kann aus der zweidimensionalen (2D) Gelelektrophorese der tRNAs aus Suppressor- und Originalstamm geschlossen werden.

Da das Laufverhalten der tRNAs in diesem Gelsystem von ihrer räumlichen Konformation abhängig ist, weist die unterschiedliche Lokalisation von tRNA^{Ser}UCN1 und 2 des Originalstammes HS2-5631 auf zwei unterschiedliche Konformationen hin. Da beide tRNAs nur durch die Modifikation einer U-Base an Pos.27 differieren, läßt dies den Schluß zu, daß diese Modifikation die räumliche Struktur der tRNA verändert (Martin et al., 1982b). Darüber hinaus konnte Davenloo et al. (1979) zeigen, daß die Modifikation einer U-Base an Pos.54 der tRNA^{Met} deren Stabilität deutlich erhöht. Aus diesem und ähnlichen Befunden schloß Björk et al. (1987), daß die Modifikation von Basen außerhalb der Anticodon-Schleife die Konformation einer tRNA stabilisieren. Daraus läßt sich rückschließen, daß die Untermodifikation der tRNA^{Ser}Sup an Pos. 27 eine destabilisierende Wirkung auf die Sekundär-/Tertiärstruktur des Moleküles ausübt.

Doch nicht nur fehlende Modifikation, sondern auch die Primärmutation C→U im Anticodon-Stamm selbst beeinflussen Struktur und Stabilität der tRNA^{Ser}Sup. Die tRNA^{Ser}Sup und die tRNA^{Ser}UCN2, denen die Modifikation der U-Base an Pos.27 fehlt, weisen nämlich auf Grund ihres Laufverhaltens in der 2D-Gelelektrophorese unterschiedliche Konformationen auf. Da beide tRNAs nur der Basenaustausch C→U an Pos.42 im Anticodon-Stamm unterscheidet, ist somit dieser Basenaustausch für die verschiedenen räumlichen Strukturen der tRNAs verantwortlich. Dabei scheint es plausibel, daß die Ursache für den Konformationsunterschied in einer Destabilisierung des Anticodon-Stammes der tRNA^{Ser}Sup zu suchen ist, da die Primärmutation C→U eine starke G-C Basenpaarung innerhalb des Anticodon-Stammes des tRNA^{Ser}UCN2-Mo-

leküles in eine schwächer wirkende G•U Basenpaarung innerhalb der tRNA^{SerSup} umwandelt.

Zusammengefaßt bedeutet dies, daß bei Vergleich der Sekundär/Tertiärstrukturen von tRNA^{SerUCN1}, 2 und tRNA^{SerSup}, letztere die wohl instabilste Konformation darstellt. Denn tRNA^{SerSup} fehlt zum einen die stabilisierende Modifikation einer U-Base an Pos.27, zum anderen besitzt ihr Anticodon-Stamm auf Grund einer G•U Basenpaarung eine reduzierte Stabilität im Verhältnis zur tRNA^{SerUCN1} und 2 (abnehmende Stabilität der tRNA Konformation : tRNA^{SerUCN1} > tRNA^{SerUCN2} > tRNA^{SerSup}).

Wie sich dies auf die Rasterschubeigenschaften der tRNA^{SerSup} auswirken könnte, wird zu einem späteren Zeitpunkt innerhalb eines Suppressionsmodelles dieser tRNA erörtert.

Aminoacylierung der tRNA^{SerSup}

Neben den strukturellen Veränderungen weist die tRNA^{SerSup} auch veränderte Aminoacylierungseigenschaften auf. Die in vitro Beladung dieser tRNA ist im Verhältnis zur tRNA^{SerUCN1} und 2 um ca. 20% reduziert. Diese Verminderung der Aminoacylierbarkeit könnte sowohl durch die Untermodifikation wie durch die veränderte räumliche Struktur des tRNA-Moleküles bedingt sein. Björk und Stråby (1977) zeigten in ihren Untersuchungen, daß der Modifikationsverlust an einer Guanin-Base an Pos.26 der cytoplasmatischen tRNA^{Ser} die in vitro Beladung der tRNA um ca. 20% reduziert. Insofern ist es möglich, daß die Untermodifikation der tRNA^{SerSup} an Pos.27 der tRNA unmittelbar die Ursache für die geringfügig geringere in vitro Beladbarkeit der tRNA darstellt. Faßt man alle Daten über Modifikation, Struktur, Stabilität und Aminoacylierbarkeit des tRNA^{SerSup}-Moleküles zusammen, so sind grundsätzlich zwei Modellvorstellungen denkbar, wie diese tRNA die +1 Rasterschubmutation M5631 supprimieren könnte.

1. Rasterschubsuppression durch Limitierung von tRNAs

Weiss und Gallant (1983) zeigten in ihren Untersuchungen, daß die

Limitierung einzelner tRNAs zur Suppression einer +1 bp lacZ-Rasterschubmutation führen kann. Die Autoren interpretierten ihre Befunde so, daß bestimmte "shifty codons" innerhalb der lacZ-mRNA auftreten, welche in der Lage sind, einen ribosomalen Rasterschub zu induzieren, wenn durch Limitierung ihrer cognaten tRNAs die Dekodierung dieser Codons verzögert wird.

In diesem Zusammenhang ist es denkbar, daß eine um 20% verminderte Aminoacylierung der tRNA^{SerSup} eine Limitierung von acylierter, UCN-Codons dekodierender tRNA^{Ser} in Mitochondrien verursachen könnte. Dies würde dann eine verzögerte Dekodierung von UCC-Serincodons bewirken, was dann nach dem oben erwähnten Modell von Weiss und Gallant einen Rasterschub an diesen Codons ermöglicht.

Gegen dieses Modell spricht, daß eine um 20% reduzierte Aminoacylierung der tRNA^{SerSup} wohl nicht ausreicht, um eine tatsächliche und signifikante Limitierung dieser tRNA-Spezies zu erreichen. Da aber bisher kein mitochondriales in vitro Translationssystem existiert, um dies zu überprüfen, kann dieses Modell nicht völlig ausgeschlossen werden. Andererseits scheint ein zweites Modell plausibler, welches die Strukturveränderungen der tRNA^{SerSup} als Ursache der +1 Rasterschubsuppression durch diese tRNA heranzieht.

2. Modell einer mitochondrialen Rasterschubsuppression basierend auf Konformationsänderungen in der tRNA^{SerSup}-Struktur

Dieses Modell bezieht die Konformationsänderungen der tRNA^{SerSup}-Struktur in die Betrachtungen mit ein. Wie in Abb.50 gezeigt, ist eine Watson-Crick Paarung der U-Base 33 in der Anticodon-Schleife der tRNA^{SerSup} mit der auf das UCC-Codon folgenden A-Base am Ort der Rasterschubmutation möglich. Somit wäre durch diese Vier-Basen-Dekodierung eine Supprimierung der +1 Rasterschubmutation M5631 vorstellbar.

Eine Watson-Crick Basenpaarung an der vierten Position der Codon-Anticodon-Erkennung ist jedoch keine unbedingte Voraussetzung für dieses Modell. Gaber und Culbertson (1984) konnten zei-

gen, daß die Codon-Erkennung durch eine +1 Rasterschubsuppressor tRNA keine Watson-Crick Basenpaarung an dieser vierten Position benötigt, obwohl durch eine solche Paarung die Effizienz der Rasterschubsuppression gesteigert werden kann. Auf Grund dieser Befunde ist deshalb auch eine sterische Protektion der auf das UCC-Codon folgenden A-Base denkbar, indem durch eine veränderte Konformation der Antidodon-Schleife der tRNA^{SerSup} die Dekodierung dieser Base durch die nachfolgende tRNA verhindert wird. Welche der Möglichkeiten auch zutrifft, sie implizieren beide eine veränderte Struktur der tRNA^{SerSup}-Anticodon-Schleife, welche entweder eine Dekodierung oder sterische Protektion der auf das UCC-Codon folgenden A-Base erlaubt.

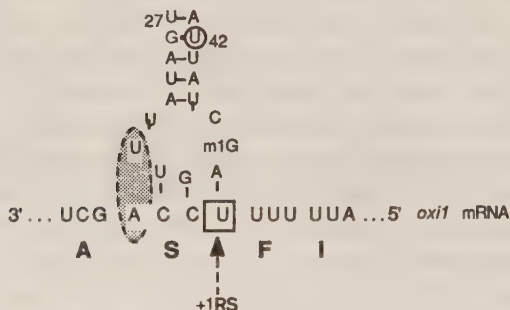


Abb.50 : Modell der Rasterschubsuppression durch die tRNA^{SerSup}

Angegeben ist der Mutationsort der Rasterschubmutation M5631 (die Insertion einer T-Base im oxi1-Gen), darunter die Aminosäuresequenz dieses Bereiches; die Wildtyp tRNA^{SerUCN} dekodiert an dieser Stelle das Serin-Codon UCC; durch zusätzliche Paarung der U33-Base in der Anticodon-Schleife der tRNA^{SerSup} mit der auf das Serincodon folgenden A-Base kann der Wildtypleserahmen wiederhergestellt werden, da dies die Dekodierung der A-Base durch die nachfolgenden tRNA verhindert; der Basenaustausch der Suppressormutation C nach U an Pos.42 des tRNA^{SerSup}-Moleküles ist angezeigt.

Eine weitere wichtige Voraussetzung für die Richtigkeit des vorgeschlagenen Modelles ist folgende : da der Suppressorstamm SEG15 nur eine einzige tRNA^{SerUCN}-Spezies enthält - nämlich tRNA^{Ser}

Sup - , welche in der Lage ist, UCN-Codons zu dekodieren, muß diese tRNA neben der +1 Rasterschubsuppression am Ort der Baseninsertion im oxil-Gen gleichzeitig alle übrigen mitochondrialen UCN-Codons - ohne einen Rasterschub zu verursachen - lesen können, um ein Wachstum des Suppressorstammes auf nicht vergärbaren Medien zu ermöglichen.

In dem entsprechenden Fall einer -1 Rasterschubsuppressor tRNA^{Gly} in *Salmonella typhimurium* wurde von Murgola (persönliche Mitteilung) daher die Vermutung aufgestellt, daß zwei unterschiedliche tRNA^{Gly} Konformationen vorhanden sein müßten, um die oben erwähnten Dekodierungseigenschaften zu erfüllen. Welche experimentellen Befunde sprechen nun für die Richtigkeit des vorgeschlagenen Rasterschubmodelles?

Zunächst gibt es in der Tat Hinweise dafür, daß die zwei von Murgola postulierten Konformationen im Falle der tRNA^{SerSup} existieren. Auf einem nicht denaturierenden Acrylamidgel war es möglich, zwei unterschiedliche räumliche Anordnungen der tRNA^{SerSup} voneinander zu trennen. Dabei ist es wohl auf die verringerte Stabilität des tRNA^{SerSup} Moleküles zurückzuführen, daß diese tRNA in zwei Konfigurationen auftritt. Zwar scheint es ungewöhnlich, daß eine einzelne tRNA Spezies verschiedene Konformationen einnimmt, doch konnten Martin et al. (nicht publiziert) zeigen, daß auch eine Wildtyp tRNA (die mitochondriale tRNA^{Phe}) in fünf verschiedenen Sekundär-/Tertiärstrukturen auftreten kann. Obwohl noch genauere Strukturuntersuchungen durchgeführt werden müssen, scheint es daher denkbar, daß die beobachteten zwei verschiedenen Konformationen der tRNA^{SerSup} die von Murgola et al. postulierten zwei unterschiedlichen räumlichen Strukturen einer Suppressor-tRNA repräsentieren : Eine Konformation ist dabei in der Lage, den Rasterschub am Mutationsort zu induzieren, während die zweite alle anderen mitochondrialen UCN-Codons dekodiert, ohne einen Rasterschub zu verursachen.

Dabei mag die "Rasterschub induzierende Konformation" durch eine Destabilisierung ihres Anticodon-Stammes gekennzeichnet sein, was zu einer Konformationsänderung der Anticodon-Schleife führen könnte und damit eine Vier-Basen-Dekodierung erlaubt. Strukturelle Interaktionen zwischen Anticodon-Stamm und Anticodon-Schleife wurden von Seong und RajBhandary (1987)

tatsächlich nachgewiesen. Die Autoren zeigten, daß Basenänderungen im Anticodon-Stamm einer tRNA^{fMet} die Konformation der Anticodon-Schleife änderten. So könnte der Basenaustausch C→U im Anticodon-Stamm der tRNA^{SerSup} die Konformation ihrer Anticodonschleife beeinflussen und damit eine Vier-Basen-Dekodierung ermöglichen (vgl. Abb.50).

Dieses Modell der Rasterschubsuppression, am Beispiel der tRNA^{SerSup} erläutert, ist natürlich vorläufig; weitere derartige Suppressormutationen müssen analysiert werden, um es tatsächlich zu bestätigen.

Widersprüche des Modells zu Experimenten von Curran und Yarus (1986)

Bis jetzt scheint der Rasterschubmechanismus der tRNA^{SerSup} ein einmaliger Fall zu sein. Dies beweisen auch Experimente von Curran und Yarus (1986). Die Autoren unternahmen ausführliche Untersuchungen an einer amber-Suppressor tRNA^{Trp} (Su7) vor, indem sie innerhalb des Anticodon-Stammes der tRNA Basenänderungen einführten, um solche Mutationen zu isolieren, welche eine Rasterschubaktivität dieser tRNA auslösen konnten.

Überraschenderweise zeigten diese Experimente, daß Basensubstitutionen im Anticodon-Stamm der tRNA^{Trp} die genaue Einhaltung des Triplettleserahmens nicht beeinflußten und somit keinen Rasterschub induzierten; insofern scheinen diese Befunde von Curran und Yarus (1986) dem vorgestellten Modell der tRNA^{SerSup}-Rasterschubsuppression zu widersprechen. Aber es gibt einige Hinweise darauf, daß dies nicht notwendigerweise so sein muß.

Denn zum einen wurden zwei völlig verschiedene tRNAs hinsichtlich ihrer Rasterschubeigenschaften untersucht : die tRNA^{SerSup} und die tRNA^{Trp}, welche sich in ihrer Primärsequenz bereits erheblich unterscheiden. So enthält die tRNA^{SerSup} auf Grund ihrer Basenzusammensetzung eine sogenannte Extra-Schleife, die tRNA^{Trp} besitzt diese nicht (siehe Abb.51). Während die tRNA^{Ser} vier A-T und eine G•U Basenpaarung im Anticodon-Stamm enthält, besitzt die tRNA^{Trp} vier G-C und eine A-T Basenpaarung. Somit sollte die tRNA^{Trp} eine - auf Grund ihrer Basenzusam-

mensetzung - erhöhte Stabilität des Anticodon-Stammes im Vergleich zur tRNA^{SerSup} aufweisen. Da Konformation und Stabilität eine entscheidende Rolle im Modell der tRNA^{SerSup} Raster-
schubsuppression spielen, könnten diese Unterschiede allein bereits Auswirkungen auf die unterschiedlichen Rasterschubkapazitäten beider tRNAs haben.



Abb.51 : Kleeblattstruktur der tRNA^{SerSup} (A) und tRNA^{Trp} Su7 (B) aus *E. coli* (nach Curran und Yarus, 1986)

Zusätzlich wird im Modell der tRNA^{SerSup} Rasterschubsuppression die Basenpaarung der U33-Base der tRNA^{SerSup} mit einer auf das UCC-Codon folgenden A-Base am Ort der Rasterschubmutation postuliert (vgl. Abb.50). Überträgt man dieses Modell auf die tRNA^{Trp}, so sollte die U33-Base in der Anticodon-Schleife dieser tRNA mit einer C-Base paaren, welche auf das von der amber-Suppressor tRNA^{Trp} gelesene UGA-Codon folgt. Da aber eine U-Base nicht in der Lage ist, mit einer C-Base eine Watson-Crick Basenpaarung einzugehen, ist in diesem System die Möglichkeit einer vier Basen Dekodierung nicht gegeben. Daher können also Unterschiede in Konformation, Stabilität und Codon-Kontext zu unterschiedlichen Ergebnissen im tRNA^{SerSup}- und tRNA^{Trp}-System führen, was deren Rasterschubeigenschaften betrifft.

Bedeutung der Ergebnisse für das Verständnis des Translationsmechanismus und ein Ausblick auf zukünftige Experimente

In dieser Arbeit konnte zum ersten Male gezeigt werden, daß strukturelle Veränderungen im Anticodon-Stamm einer tRNA die Einhaltung des Triplettleserahmens verringern. Ungeachtet des genauen Rasterschubmechanismus wird am Beispiel der Suppressor tRNA^{SerSup} deutlich, daß eine +1 Rasterschubsuppression auch von tRNAs mit Mutationen außerhalb der Anticodon-Schleife verursacht werden kann. Dies deutet darauf hin, daß nicht nur die Anticodon-Schleife selbst, sondern auch andere Bereiche eines tRNA-Moleküles (wie der Anticodon-Stamm) an der Einhaltung der Translationsgenauigkeit unmittelbar beteiligt sind.

Zusammen mit der in Kapitel I beschriebenen par^r-454 Mutation innerhalb des 15S rRNA Genes wurden damit in dieser Arbeit zwei Bereiche mitochondrialer Translationsfaktoren (das 3'-Ende der 15S rRNA und der Anticodon-Stamm von tRNAs) identifiziert, welche die Einhaltung eines vorgegebenen Leserahmens beeinflussen. Natürlich sind weitere Komponenten vorstellbar, welche an diesem Prozeß beteiligt sind. So etwa ribosomale Proteine, die mitochondriale 21S rRNA oder auch andere strukturelle Bereiche eines tRNA Moleküles.

Die Analyse von Mutationen in Genen für diese Translationsfaktoren im Rasterschubstamm M5631 wird weitere funktionale Bereiche dieser Moleküle aufdecken und somit letztlich zu einem besseren molekularen Verständnis des Translationsvorganges der Proteinbiosynthese führen.

Zusammenfassung

Mutationen in Genen mitochondrialer Translationsfaktoren, welche die Einhaltung des Triplet Leserahmens beeinflussen

Die mitochondriale Rasterschubmutation M5631 (die Insertion einer T-Base im oxil-Gen) wird im Hefestamm M5631, der diese Mutation trägt, spontan supprimiert (Fox und Weiss-Brummer, 1980). Dies geschieht dadurch, daß der mitochondriale Wildtyptranslationsapparat des betreffenden Stammes eine Verschiebung des mutativ veränderten Triplet Leserahmens zurück in den Wildtyp Leserahmen ermöglicht (Weiss-Brummer et al., 1987). Durch die Isolierung und Analyse zweier mitochondrialer Mutationen, welche diesen spontanen Leserahmenwechsel der Rasterschubmutante M5631 verstärkten, bzw. verminderten, konnten zwei Strukturelemente mitochondrialer Translationskomponenten identifiziert werden, die an der Einhaltung eines vorgegebenen Leserahmens beteiligt sind; diese Strukturelemente stellen das 3'-Ende der kleinen ribosomalen RNA (15S rRNA) und der Anticodon-Stamm mitochondrialer tRNAs dar.

So ergaben Untersuchungen dieser Arbeit, daß der spontane Leserahmenwechsel der Mutante M5631 durch den Basenaustausch C→G an Pos.1479 der mitochondrialen 15S rRNA (par^r-454 Mutation) erheblich erniedrigt wurde. Mit anderen Worten bedeutet dies, daß die par^r-454 Mutation eine Erhöhung der mitochondrialen Translationsgenauigkeit im Bezug auf die Einhaltung des Triplet Leserahmens verursacht. Gleichzeitig heißt das, daß die ursprüngliche C-Base an Pos.1479 in der 15S rRNA der Mutante M5631 den spontanen Leserahmenwechsel ermöglicht und dadurch zur spontanen Suppression der Rasterschubmutation M5631 beiträgt. Somit konnte durch diese Experimente erstmals ein bestimmter Bereich (d.h. die Base an Pos.1479) einer ribosomalen RNA identifiziert werden, welcher direkt an der Einhaltung eines vorgegebenen Leserahmens beteiligt ist.

Zudem ergaben diese Untersuchungen, daß die par^r-454 Mutation, welche anderen Wildtypstämmen (KL14-4A bzw. D273-10B/A21)

Paromomycinresistenz verleiht, in der Rasterschubmutante M5631 und im zugehörigen Wildtypstamm 777-3A allein nicht ausreichend ist, um Resistenz gegen dieses Antibiotikum zu erzeugen; erst zusammen mit einer spontan auftretenden Zweitmutation (Häufigkeit 10^{-4}) wird dies ermöglicht. Dies zeigt, daß hinsichtlich der Resistenz gegen das Antibiotikum Paromomycin Stammpoly-morphismen auftreten.

Eine weitere Mutation, welche im Gegensatz zur *par^f-454* Mutation die Leseungenauigkeit erhöht, wurde im Gen der mitochondrialen tRNA^{Ser}UCN isoliert und analysiert. Die Mutation, ein Basenaustausch C nach U an Pos.42 im Anticodon-Stamm des tRNA Moleküles, bedingt gleichzeitig einen Modifikationsverlust an Pos.27 der tRNA; es konnte gezeigt werden, daß der Basenaustausch und der Modifikationsverlust zu einer Konformationsänderung der tRNA führen. Auf Grund dieser strukturellen Veränderung wurde ein Modell diskutiert, nachdem diese Suppressor tRNA (tRNA^{Ser}Sup) in der Lage ist, vier Basen zu dekodieren und damit die M5631 Rasterschubmutation zu supprimieren; diese tRNA Mutation induziert somit eine Verschiebung des Triplettlese-rahmens. Im Gegensatz zu allen anderen +1 Rasterschubsuppressor tRNAs in Pro- und Eukaryonten, welche ihre Mutation in der Anticodon-Schleife tragen, enthält diese tRNA ihre Suppressor-mutation im Anticodon-Stamm. Dies impliziert, daß nicht wie bisher vermutet, allein die Anticodon-Schleife, sondern auch andere Regionen eines tRNA Moleküles (d.h. der Anticodon-Stamm) an der Einhaltung des Leserahmens beteiligt sind.

Optionale AT-Cluster in der 15S rRNA

Bei der Analyse der mitochondrialen 15S rRNA (siehe oben) wurden erstmals im mitochondrialen Genom optionale AT-Cluster identifiziert. Bis zu diesem Zeitpunkt waren nur GC-Cluster (GC-Gehalt > 60%) im mitochondrialen Genom bekannt, die als transposable Elemente angesehen werden. Durch Sequenzierung und Vergleich der 15S rRNA Gene aus vier verschiedenen Wildtyp-stämmen war es möglich, zwei unterschiedliche AT-Cluster (ATCL1 und ATCL2) zu identifizieren, welche in den jeweiligen Stämmen

an einer bestimmte Stelle des 15S rRNA Genes integriert sind. Diese Cluster besitzen eine Länge von 16bp und bestehen ausschließlich aus A- und T-Basen.

Es wurden einige Hinweise dafür gefunden, daß diese neue Cluster-Spezies - entsprechend den GC-Clustern - eine Gruppe von transposablen Elementen darstellt, welche an Rekombinationsprozessen des mitochondrialen Genomes teilnehmen. Solche Rekombinationsprozesse werden bei der rho-Entstehung (der Exzision großer Bereiche des mitochondrialen Genomes) diskutiert. Tatsächlich konnte die Beteiligung eines AT-Clusters (ATCL1) bei der Exzision eines DNA-Abschnittes aus dem mitochondrialen Genom nachgewiesen werden. Dies bestätigt die wichtige Rolle, die diese Cluster vermutlich in Rekombinations- bzw. Transpositionsprozessen einnehmen.

Literaturverzeichnis

- Avner, P.R. , Coen, D. , Dujon, B. and Slonimski, P.P. (1973)
Mol. Gen. Genet., 125, 9-52
- Altman, S. (1971)
Nature, 229, 19-20
- Baldacci, G. , Falcone, C. , Frontali, L. , Macino, G. and Palleschi, C.
(1976) In : Bücher, T. , Neupert, W. , Sebald, W. and Werner, S.
(eds), Genetics and Biogenesis of Chloroplasts and Mitochondria,
North-Holland Publishing Co., Amsterdam, pp 759-762
- Beauclerc, A.A.D. and Cundliffe, E. (1987)
J. Mol. Biol., 193, 661-671
- Bechman, H. (1981)
Doktorarbeit, Ludwig-Maximilian-Universität München, München
- Bernardi, G. (1982) In : Slonimski, P.P. , Borst, P. and Attardi, G.
(eds), Mitochondrial Genes, Cold Spring Harbor, N.Y., pp 269-278
- Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979)
Nucleic Acids Res., 7, 1513-1523
- Björk, G.R. and Kjellin-Straby, K. (1977) In : Salvatore, F. , Borek, E.
Zappia, V. , William-Asham, H.G. , Schlenk, F. (eds) New York
Columbia University Press, pp 216-230
- Björk, G.R. , Ericson J.U. , Gustafsson C.E.D. , Hagervall, T.G. , Jönsson,
Y.H. and Wikström, P.M. (1987)
Ann. Rev. Biochem., 56, 263-287
- Bonitz, S.G. , Homison, G. , Thalenfeld, B.E. and Tzagoloff, A. (1982)
J. Mol. Chem., 257, 6268-6274
- Bossi, L. and Roth, J.R. (1980)
Nature, 286, 123-127
- Bossi, L. and Smith, D.M. (1984)
Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 84, 6105-6109
- McClain, W.A. , Barell, B.G. and Seidman, J.G. (1975)
J. Mol. Biol., 99, 717-732

- Coen, D. , Deutsch, J. , Netter, P. , Petrochilio, E. and Slonimski, P.P. (1970) In : Miller, P.L. (ed) Mitochondrial genetics, I Methodology and phenomenology, University Press, Cambridge, pp 449-496
- Conde, J. and Fink, G.R. (1976)
Proc. Natl. Acad. Sci., 73, 3651-3655
- Craigien, W.J. and Caskey, C.T. (1987)
Cell, 50, 1-2
- Christianson, T. , Edwards, J. , Levens, D. , Locker, J. and Rabinowitz, M. (1982)
J. Biol. Chem., 257, 6494-6500
- Cummins, C.M. , Donahue, T.F. and Culbertson, M.R. (1982)
Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 79, 3565-3569
- Cummins, C.M. , Culbertson, M.R. and Knapp, G. (1985)
Molecular and Cellular Biology, 5, 1760-1771
- Curran, J.F. and Yarus, M. (1986)
Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 83, 6538-6542
- Davenloo, P. , Sprinzl, M. , Watanabe, K. , Albani, M. and Kersten, H. (1979)
Nucleic Acids Res., 6, 1571-1581
- Donis-Keller, H. , Maxam, A.M and Gilbert, W. (1977)
Nucleic Acids Res., 4, 2527-2538
- Douglas, M. and Butow, R.A. (1976)
Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 73, 1083-1086
- Dujardin, G. , Pajot, P. , Groundinsky, O. and Slonimski, P.P. (1980)
Mol. Gen. Genet., 179, 469-482
- Fangman, W.L. and Dujon, B. (1984)
Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 81, 7156-7160
- Fox, T.D. and Weiss-Brummer, B. (1980)
Nature, 288, 60-63
- Fox, T.D. and Staempfli, S. (1982)
Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 79, 1538-1587

De Franco, D. , Schmidt, O. and Söll, D. (1980)
Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 77, 3365-3368

Gaber, R.F. and Culbertson, M.R. (1982)
Gene, 19, 163-172

Gaber, R.F. and Culbertson, M.R. (1984)
Molecular and Cellular Biology, 4, 2052-2061

Gorini, L (1974) In : Nomura, M. , Tissieres, A. , Lengyel, P. (eds)
Ribosomes, Cold Spring Harbor Laboratory Monograph Series, Cold
Spring Harbor, New York, pp 791-803

Grosch, G. (1980)
Doktorarbeit, Universität München

Hughes, D. , Atkins, J.F. and Thompson, S. (1987)
EMBO J., 6, 4235-4239

Hüttenhofer, A. , Sakai, H. and Weiss-Brummer, B. (1988)
Nucleic Acids Res., 16, 8665-8674

Hudspeth, M.E. , Ainley, W.M. , Shumard, D.S. , Butow, R.A. and
Grossman, L.I. (1982)
Cell, 30, 617-626

Hui, A.S. , Eaton, D.H. and de Boer, P. (1988)
EMBO J., 7, 4383-4388

Huysmans, E. and De Wachter, R. (1986)
Nucleic Acids Res., 14, 73-118

Jacks, T. and Varmus, H.E. (1985)
Science, 230, 1237-1242

Koski, R.A. , Clarkson, S.G. , Kurjan, J. , Hall, B.D. and Smith, M.
(1980)
Cell, 22, 415-425

Kotylak, Z. and Slonimski, P.P. (1977) In : Bandlow, W. , Schweyen,
R.J. , Wolf, K. and Kaudewitz, F. (eds) Genetics and biogenesis of
mitochondria, De Gruyter, Berlin, pp 83-89

Kurland, C.G. (1979) In : Celis, J.E. and Smith, J.D. (eds) Reading
frame errors on ribosomes, Academic Press, London, New York,
San Francisco, pp 97-108

- Kutzleb, R. , Schweyen, R.J. and Kaudewitz, F. (1973)
Mol. Gen. Genet., 125, 91-98
- Lämmli, U.K. (1970)
Nature, 227, 680-685
- Lancashire, W.E. and Matton, J.R. (1979)
Mol. Gen. Genet., 170, 333-344
- Lang, B. , Burger, G. , Doxiades, I. , Thomas, D.Y. , Bandlow, W. and Kaudewitz, F. (1977)
Anal. Biochem., 77, 110-121
- Lewin, A. , Maritimo, R. , Rabinowitz, M. and Fukuhara, A. (1978)
Mol. Gen. Genet., 163, 257-275
- Li, M. , Tzagoloff, A. , Underbrink-Lyon, K. and Martin, N.C. (1982)
J. Biol. Chem., 257, 5921-5928
- Locker, J. (1979)
Anal. Biochem., 98, 358-367
- Mahoney, D.J. , Mims, B.H. , Thompson, S. , Murgola, E.J. and Atkins, J.F. (1989)
Proc. Natl. Acad. Sci., eingereicht;
- Maniatis, T. , Fritsch, E.F. and Sambrook, J. (1982)
Molecular cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Martin, R. , Schneller, J.M. , Stahl, A.J.C. and Dirheimer, G. (1977)
Nucleic Acids Res., 4, 3497-3510
- Martin, R. , Bordonne, R. and Dirheimer, G. (1982a)
In : Cell Function and Differentiation; Alan R. Liss, Inc.
New York, N.Y. 10011
- Martin, R. , Sibling, A.-P. and Dirheimer, G. (1982b)
Biochimie, 64, 1073-1079
- Maxam, A. and Gilbert, W. (1980)
Meth. Enzymol., 65, 499-560
- Messing, J. , Crea, R. and Seeburg, P.H. (1981)
Nucleic Acids Res., 9, 309-321

- Messing, J. (1983)
Methods Enzymol., 101, 20-78
- Miller, D.L. , Martin, N.C. , Pham, H.D. and Donelson, J.E. (1979)
J. Biol. Chem., 22, 11735-11740
- Moazed, D. , Stern, S. and Noller, H.F. (1986)
J. Mol. Biol., 187, 399-416
- Moazed, D. and Noller, H.F. (1986)
Cell, 47, 985-994
- Moazed, D. and Noller, H.F. (1987)
Nature, 327, 389-394
- Needleman, R.B. and Tzagoloff, A. (1975)
Anal. Biochem., 64, 545-549
- Ninio, J. (1974)
J. Mol. Biol., 84, 297-313
- Noller, H.F. (1984)
Ann. Rev. Biochem., 53, 119-162
- Noller, H.F. , Asire, M. , Barta, A. , Douthwaite, S. , Goldstein, T. , Gutell, R.P. , Moazed, D. , Normanly, J. , Prince, T.B. , Stern, S. , Triman, K. , Turner, S. , van Stolk, B. , Wheaton, W. , Weiser, B. and Woese, C.R. (1985) In : Hardesty, B. and Kramer, G. (eds), Structure, Function and Genetics of Ribosomes, Springer-Verlag, Berlin, pp 143-163
- Novitski, C.E. , Macreadie, I.G. , Maxwell, R.J. , Lukins, H.B. , Linnane, A.W. and Nagely, P. (1983)
Curr. Genet., 8, 135-146
- Oakes, M.I. , Clark, M.W. , Henderson, E. and Lake, J.A. (1986)
Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 63, 275-279
- Ofengand, J. , Ciesiolka, J. , Denman, R. and Nurse, K. (1986)
In : Hardesty , B. and Kramer, G. (eds) Structure, Function and Genetics of Ribosomes, Springer Verlag, N.Y., pp 473-494
- Peattie, D.A. (1979)
Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 76, 1760-1764

- Piepersberg, W. , Geyl, D. , Hummel, H. and Böck, A. (1980)
In : Osawa, S. , Ozeki., H. , Uchida, H. and Yura, T. (eds) Genetics and Evolution. Springer Verlag, N.Y., pp 473-494
- Pritchard, A.E. and Cummins, D.J. (1981)
Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 78, 7341-7345
- Prunell, A. and Bernardi, G. (1974)
J. Mol. Biol., 86, 825-841
- Riddle, D. and Carbon, J. (1973)
Nature, 242, 230-234
- Rigby, P.W. , Dieckman, M. , Rhodes, C. and Berg, P. (1977)
J. Mol. Biol., 113, 237-251
- Roth, J.R. , Anton, D.N. and Hartman, P. (1966)
J. Mol. Biol., 22, 305-323
- Ruusala, T. , Andersson, D. , Ehrenberg, M. and Kurland, C.G. (1984)
EMBO J., 3, 2575-2580
- Sanger, F. , Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977)
Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 74, 5463-5467
- Sanger, F. , Coulson, A.R. , Barell, B.F. , Smith, A.Z.H. and Roe, B. (1980)
J. Mol. Biol., 143, 161-178
- Schneller, J.M. (1977)
Doktorarbeit, Universität Louis-Pasteur, Strasbourg
- Seong, B.L. and RajBhandary, U.L. (1987)
Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 84, 334-338
- Sor, F. and Fukuhara, H. (1982a)
In : Slonimski, P. , Borst, P. , Attardi, G (eds) Mitochondrial Genes, Cold Spring Harbor Monograph 12, Cold Spring Harbor, N.Y., pp 255-262
- Sor, F. and Fukuhara, H. (1982b)
Nucleic Acids Res., 10, 1625-1633
- Southern, E.M. (1975)
J. Mol. Biol., 98, 503-517

De Stasio, E.A. , Moazed, D. , Noller, H.F. and Dahlberg, A.E. (1989)
EMBO J., 8, 1213-1216

Tabak, H.F. , Van der Laan, J.C. , Landegent, J.E. , Evers, R.F. and
Wassenaar, G.M. (1982)
Plasmid, 8, 261-275

Tabor, S. and Richardson, C.C. (1987)
Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 84, 4767-4771

Thompson, J.F. and Hearst, J.E. (1983)
Cell, 33, 19-24

Tucker, S.D. , Murgola, E.J. and Pagel, F.T. (1989)
Biochimie, im Druck;

Yanish-Perron, C. , Vieira, J. and Messing, J. (1985)
Gene, 33, 103-119

Weiller, G. (1987)
Doktorarbeit, Ludwig-Maximilian-Universität München, München

Weiss, R.B. and Gallant, J.A. (1983)
Nature, 302, 389-393

Weiss, B.R. , Dunn, D.M. , Dahlberg, A.E. , Atkins, J.F. and Gesteland,
R.F. (1988)
EMBO J., 7, 1503-1507

Weiss-Brummer, B. , Guba, R. , Haid, A. and Schweyen, R.J. (1979)
Curr. Genet., 1, 75-83

Weiss-Brummer, B. , Hüttenhofer, A. and Kaudewitz, F. (1984)
Mol. Gen. Genet., 198, 62-68

Weiss-Brummer, B. , Sakai, H. and Kaudewitz, F. (1987)
Curr. Genet., 11, 295-301

Winey, M. , Mendenhall, M.D. , Cummins, C.M. and Culbertson, M.R.
(1986)
J. Mol. Biol., 192, 49-63

Wolf, K. , Dujon, B. and Slonimski, P.P. (1973)
Mol. Gen. Genet., 125, 53-90

de Zamaroczy, M. , Faugeron-Fonty, G. and Bernardi, G. (1983)
Gene, 21, 193-202

de Zamaroczy, M. and Bernardi, G. (1986a)
Gene, 41, 1-22

de Zamaroczy, M. and Bernardi, G. (1986b)
Gene, 47, 155-127

de Zamaroczy, M. and Bernardi, G. (1987)
Gene, 54, 1-22

DANKSAGUNG

Am Ende dieser Arbeit möchte ich allen herzlich danken, die zu ihrer Entstehung beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt :

- Prof. Dr. F. Kaudewitz für die Bereitstellung des Themas und eines Arbeitsplatzes,
- Frau Dr. B. Weiss-Brummer für ihre engagierte wissenschaftliche Betreuung und stete Diskussionsbereitschaft,
- Prof. G. Dirheimer und Prof. Dr. R. Martin für ihre umfassende Betreuung während meines Gastaufenthalts in Strasbourg,
- Prof. Dr. G. Rödel , Prof. Dr. W. Bandlow und Dr. A. Haid für ihre Diskussionsbereitschaft und ihr stetes Interesse an den Versuchsergebnissen,
- meinem "Mitstreiter" Hajime Sakai für seine fortwährende Hilfs- und Diskussionsbereitschaft,
- K. Schwarz und R. Teufel für die rege Mitarbeit und das entgegengebrachte Interesse während ihres Großpraktikums in unserem Labor,
- Frau A. Heine, Frau M. Schichtel und Frau G. Strobl für ihre Unterstützung und praktischen Hinweise,
- Hans Koll und Thomas Söllner für ihre Hilfe bei der densitometrischen Analyse von Autoradiogrammen,
- Barbara Wild, Irmgard Lösch und meiner Mutter für die grammatikalische Überprüfung dieser Arbeit,
- allen anderen Mitarbeitern des Institutes für ihre Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima,

- der Hanns-Seidel-Stiftung für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit, den Organisationen EMBO und FEBS für die Finanzierung eines 4-monatigen Arbeitsaufenthalts am Institut de Biologie Moleculaire et Cellulaire du CNRS in Strasbourg (Frankreich).

LEBENS LAUF

Alexander Hüttenhofer

geboren am 1. 5. 1958 in Neuburg / a. d. Donau

1964 - 1965	Besuch der Volksschule Gersthofen
1965 - 1968	Besuch der Volksschule Ottmarshausen
1968 - 1977	Besuch des Justus-von-Liebig-Gymnasiums in Neusäß
1977	Abitur
1977 - 1983	Studium der Biologie an der Ludwig- Maximilian-Universität in München
1983 - 1985	Diplomarbeit am Institut für Genetik und Mikrobiologie der Universität München
1985	Beginn der Dissertationsarbeit am Institut für Genetik und Mikrobiologie der Universi- tät München bei Prof. Dr. F. Kaudewitz
1989	Gastaufenthalt am Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire du CNRS in Stras- bourg (Frankreich) bei Prof. Dr. R. Martin

